

TESE DE DOUTORAMENTO

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS
NANOESTRUCTURADOS MAGNÉTICOS CON
POTENCIALES APLICACIONES EN BIOMEDICINA
Y ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES**

Alberto Pardo Montero

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE MATERIALES

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2018



DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

Diseño y caracterización de sistemas nanoestructurados magnéticos con potenciales aplicaciones en biomedicina y eliminación de contaminantes

D. Alberto Pardo Montero

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela, 19 de Outubro de 2018

Asdo. Alberto Pardo Montero



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE
**Diseño y caracterización de sistemas nanoestructurados
magnéticos con potenciales aplicaciones en biomedicina y
eliminación de contaminantes**

D. Pablo Taboada Antelo
Dna. Silvia Barbosa Fernández

INFORMAN:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. Alberto Pardo Montero, baixo a nosa dirección, e autorizamos a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como directores desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 19 de Outubro de 2018

Asdo. Pablo Taboada Antelo

Asdo. Silvia Barbosa Fernández



Contenidos

Lista de publicaciones	vii
Lista de abreviaturas	xi
Lista de figuras	xv
Lista de tablas	xxvii
Agradecimientos	xxxii
Resumen	xxxiii
Summary	xli
1. Introducción	1
1.1. Magnetismo en materiales	1
1.1.1. Tipos de magnetismo. Ciclos de histéresis	1
1.1.2. Superparamagnetismo	5
1.2. Nanopartículas magnéticas (MNPs)	12
1.2.1. Síntesis	13
1.2.2. Propiedades	15
1.2.3. Aplicaciones	23
1.2.3.1. Aplicaciones tecnológicas	24
I. Almacenamiento de información	24
II. Tratamiento de agua contaminada	26
III. Otras aplicaciones tecnológicas	28
1.2.3.2. Aplicaciones biomédicas	30
I. Transporte y liberación de fármacos	36
II. Magnetofección y acumulación magnética	39
III. Hipertermia (MFH)	40
IV. Imagen por resonancia magnética (MRI)	49
V. Imagen multimodal	54
VI. Otras aplicaciones biomédicas	58
1.3. Copolímeros de bloque. Sistemas de MNPs en película delgada	59
1.3.1. Copolímeros en disolución	60
1.3.2. Copolímeros en fase sólida y película delgada: uso como nanopatrones	63
1.3.3. Sistemas híbridos en película delgada: copolímeros y NPs	65

1.3.4. Métodos de preparación de películas delgadas	68
1.4. Objetivos	71
1.5. Bibliografía	73
2. Nanopartículas magnéticas de forma cúbica	93
2.1. Materiales y métodos	94
2.1.1. Materiales	94
2.1.2. Síntesis	95
2.1.3. Transferencia de los sistemas a medio acuoso	97
2.1.4. Análisis del nivel de recubrimiento, agregación y estabilidad coloidal de las MNPs	100
2.1.5. Técnicas de caracterización	101
2.2. Resultados y discusión	103
2.2.1. Influencia de las condiciones sintéticas y caracterización estructural de las MNPs de forma cúbica	103
2.2.1.1. Influencia de la etapa de vacío y de la concentración de precursor férrico	109
2.2.1.2. Influencia del tiempo y la temperatura de reacción	112
2.2.1.3. Influencia de la velocidad de calentamiento	114
2.2.1.4. Influencia de la razón molar entre agente estabilizante y precursor férrico	117
2.2.1.5. Influencia del dopaje	119
2.2.2. Transferencia a medio acuoso y estabilidad de las MNPs de forma cúbica	130
2.2.2.1. Estudio de las MNPs transferidas a medio acuoso por recubrimiento polimérico mediante medidas de TEM y DLS	130
2.2.2.2. Estudio de las MNPs transferidas a medio acuoso por recubrimiento polimérico mediante medidas de FTIR y determinación del potencial ζ	136
2.2.2.3. Estudio de la estabilidad en medios biológicos de las MNPs transferidas a medio acuoso por recubrimiento polimérico	139

2.2.2.4. Estudio de las MNPs transferidas a medio acuoso por intercambio de ligando mediante medidas de TEM, DLS, FTIR y determinación del potencial ζ	147
2.2.2.5. Estudio de la estabilidad en medios biológicos de las MNPs transferidas a medio acuoso por intercambio de ligando	151
2.2.3. Caracterización magnética de los sistemas	154
2.2.3.1. Efecto de la temperatura sobre los ciclos de histéresis	155
2.2.3.2. Efecto del tamaño y la morfología de las MNPs sobre los ciclos de histéresis	160
2.2.3.3. Efecto del dopaje de las MNPs cúbicas sobre los ciclos de histéresis	165
2.3. Bibliografía	176
3. Nanopartículas magnéticas de forma esférica y estructuras magnéticas núcleo-coraza	183
3.1. Materiales y métodos	183
3.1.1. Materiales	183
3.1.2. Síntesis	184
I. MNPs de forma esférica	185
II. MNPs con estructura núcleo-coraza	185
3.1.3. Transferencia de los sistemas a medio acuoso	187
3.1.4. Análisis del nivel de recubrimiento, agregación y estabilidad coloidal de las MNPs	189
3.1.5. Técnicas de caracterización	190
3.2. Resultados y discusión	192
3.2.1. Influencia de las condiciones sintéticas y caracterización estructural de las MNPs de forma esférica	192
3.2.1.1. Influencia de la etapa de vacío, del ritmo de calentamiento y de la concentración de precursor férrico	194
3.2.1.2. Influencia del dopaje y escalabilidad	197
3.2.2. Transferencia a medio acuoso y estabilidad de las MNPs de forma esférica	207

3.2.2.1. Estudio de las MNPs de forma esférica transferidas a medio acuoso mediante medidas de TEM y DLS	207
3.2.2.2. Estudio de las MNPs de forma esférica transferidas a medio acuoso mediante la determinación del potencial ζ	212
3.2.2.3. Estudio de la estabilidad de las MNPs de forma esférica en medios biológicos	215
3.2.3. Influencia de las condiciones sintéticas y caracterización estructural de las MNPs núcleo-coraza	226
3.2.3.1. Síntesis y caracterización de núcleos de diferentes tamaños	227
3.2.3.2. Síntesis y caracterización de estructuras núcleo-coraza	228
3.2.4. Transferencia a medio acuoso y estabilidad de las MNPs con estructura núcleo-coraza	240
3.2.4.1. Estudio de las MNPs con estructura núcleo-coraza transferidas a medio acuoso mediante medidas de DLS	241
3.2.4.2. Estudio de las MNPs con estructura núcleo-coraza transferidas a medio acuoso mediante la determinación del potencial ζ	244
3.2.5. Caracterización magnética de las MNPS obtenidas	246
3.2.5.1. Ciclos de histéresis y curvas FC-ZFC de las MNPs de forma esférica	247
3.2.5.2. Efecto del dopaje sobre las propiedades magnéticas de las MNPs de forma esférica	254
3.2.5.3. Ciclos de histéresis y curvas FC-ZFC de las MNPs con estructura núcleo-coraza	265
3.2.5.4. Efecto de los tamaños y composiciones sobre las propiedades magnéticas de las MNPs con estructura núcleo-coraza	269
3.3. Bibliografía	275
4. Sistemas ordenados de nanopartículas de óxido de hierro en película delgada	281
4.1. Materiales y métodos	281
4.1.1. Materiales	281
4.1.2. Síntesis de las películas delgadas	283
4.1.3. Técnicas de caracterización	286

4.2. Resultados y discusión	287
4.2.1. Variación de los parámetros de síntesis: Optimización del proceso de preparación de las películas delgadas	287
4.2.1.1. Estudio del efecto del disolvente	288
4.2.1.2. Estudio del efecto de la temperatura de mezcla	290
4.2.1.3. Estudio del efecto de la temperatura de reacción	292
4.2.1.4. Estudio del efecto de la razón molar P4VP-FAA y del tratamiento de las películas delgadas en vacío primario o atmósfera de dioxano	295
4.2.1.5. Estudio del efecto de la razón molar P4VP-FAA y del tratamiento de las películas delgadas mediante plasma de oxígeno o calcinación	298
4.2.2. Caracterización estructural de las películas delgadas	305
4.2.3. Estudio del espesor de las películas delgadas	313
4.3. Bibliografía	318
5. Aplicaciones	323
5.1. Materiales y métodos	324
5.1.1. Materiales	324
5.1.2. Síntesis y transferencia de las MNPs a medio acuoso	325
5.1.3. Medidas de hipertermia y relajación magnéticas	325
5.1.4. Análisis de la citotoxicidad, de la internalización celular y de las propiedades magnéticas de las MNPs dentro de las células	327
5.1.5. Eliminación de metales pesados en medios acuosos	329
5.1.6. Técnicas de caracterización	329
5.2. Resultados y discusión	332
5.2.1. Medidas de la capacidad hipertérmica y la relajación transversal de las MNPs	332
5.2.1.1. Medidas de la capacidad hipertérmica de las MNPs de forma cúbica	332
5.2.1.2. Medidas de la capacidad hipertérmica de las MNPs de forma esférica	340

5.2.1.3. Discusión comparativa de la capacidad hipertérmica de las MNPs de forma cúbica y esférica	349
5.2.1.4. Medidas de la relajación transversal de las MNPs de forma cúbica	353
5.2.1.5. Medidas de la relajación transversal de las MNPs de forma esférica	357
5.2.1.6. Medidas preliminares de la capacidad hipertérmica y de la relajación transversal de las MNPs con estructura núcleo-coraza	365
5.2.2. Ensayos <i>in vitro</i> : Cultivos celulares	366
5.2.2.1. Análisis de la citotoxicidad celular de las MNPs	367
5.2.2.2. Análisis de la internalización celular de las MNPs	373
5.2.2.3. Análisis de las propiedades magnéticas de las MNPs internalizadas en las células	376
5.2.3. Depuración de medios acuosos contaminados con metales pesados	385
5.2.3.1. Depuración de medios acuosos contaminados con arsénico	389
5.2.3.2. Depuración de medios acuosos contaminados con mercurio	393
5.2.3.3. Depuración de medios acuosos contaminados con arsénico y mercurio	397
5.2.3.4. Análisis del efecto del pH del medio y de la tipología de las MNPs en la adsorción de metales pesados	400
5.2.3.5. Modelización de las isotermas de adsorción de metales pesados sobre las MNPs	403
5.2.3.6. Cinéticas de adsorción de los metales pesados	406
5.3. Bibliografía	411
6. Conclusiones/Conclusions	419

Lista de publicaciones

Este trabajo de Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones en revistas, libros y congresos:

i) Publicaciones en revistas:

1. **Alberto Pardo**, Rosa Pujales, Mateo Blanco, Eva M. Villar, Silvia Barbosa, Pablo Taboada y Víctor Mosquera. *Analysis of the influence of synthetic parameters on the structure and physicochemical properties of non-spherical iron oxide nanocrystals and their biological stability and compatibility*. Dalton Transactions, 45, 797-810 (2016).
2. **Alberto Pardo**, Mateo Blanco, Silvia Barbosa, Pablo Taboada y Víctor Mosquera. *Analysis of the influence of block copolymer lithography synthetic parameters on the characteristics of hematite nanoparticles periodic arrays*. En preparación.
3. **Alberto Pardo**, Beatriz Pelaz, Pablo del Pino, Susana Yáñez, Yolanda Piñeiro, Silvia Barbosa, José Rivas y Pablo Taboada. *Evaluation of ferrimagnetic doped cubic nanoparticles as potential tools in magnetic resonance imaging and hyperthermia*. En preparación.
4. **Alberto Pardo**, Francisco Rivadulla, Beatriz Pelaz, Silvia Barbosa, Wolfgang Parak, Pablo del Pino y Pablo Taboada. *Synthesis, characterization and evaluation of superparamagnetic doped ferrites as potential therapeutic tools*. En preparación.
5. **Alberto Pardo**, Beatriz Pelaz, Pablo del Pino, Silvia Barbosa, Wolfgang Parak y Pablo Taboada. *Implementation of highly-monodispersed magnetic nanoparticles for removal of arsenic and mercury in water*. En preparación.

ii) Contribuciones a congresos:

1. **Alberto Pardo**, Silvia Barbosa, Pablo Taboada y Víctor Mosquera. *Fabricación y caracterización de sistemas ordenados de nanopartículas de óxido de hierro mediante litografía de copolímeros de bloque*. II Encontro da Mocidade Investigadora (Enero 2014: Santiago de Compostela, España).
2. **Alberto Pardo**, Mateo Blanco, Silvia Barbosa, Pablo Taboada y Víctor Mosquera. *Síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita de forma cúbica*. III Encontro da Mocidade Investigadora (Marzo 2015: Santiago de Compostela, España).
3. **Alberto Pardo**, Rosa Pujales, Mateo Blanco, Silvia Barbosa, Pablo Taboada y Víctor Mosquera. *Synthesis and characterization of magnetite nanocubes formed by thermal decomposition*. VI Iberian Meeting of Colloids and Interfaces (Julio 2015: Guimaraes, Portugal).
4. **Alberto Pardo**, Eva M. Villar, Mateo Blanco, Silvia Barbosa y Pablo Taboada. *Evaluation of up-converting nanomaterials as potential imaging and therapeutic tools*. IX International Forum on Advances in Pharmaceutical Technology – CISDEM (Noviembre 2015: Santiago de Compostela, España).
5. **Alberto Pardo**, Raquel Martínez, Eva M. Villar, Mateo Blanco, Silvia Barbosa, Pablo Taboada y Víctor Mosquera. *Synthesis, characterization and evaluation of biomedical potential applications of magnetic cubic nanoparticles*. III Reunión de Jóvenes Investigadores en Coloides e Interfases. (Octubre 2016: Madrid, España).
6. **Alberto Pardo**, Mateo Blanco, Beatriz Pelaz, Pablo del Pino, Francisco Rivadulla, Wolfgang Parak, Silvia Barbosa y Pablo Taboada. *Synthesis, characterization and evaluation of magnetic doped ferrites as potential hyperthermia agents*. BioMap17: II biennial Young researches Workshop on Biomaterials and Applications (Mayo 2017: Santiago de Compostela, España).

7. **Alberto Pardo**, Mateo Blanco, Beatriz Pelaz, Pablo del Pino, Francisco Rivadulla, Wolfgang Parak, Silvia Barbosa y Pablo Taboada. *Synthesis, characterization and evaluation of magnetic doped ferrites as potential therapeutic tools*. V Encontro da Mocidade Investigadora (Junio 2017: Santiago de Compostela, España).
8. **Alberto Pardo**, Mateo Blanco, Beatriz Pelaz, Pablo del Pino, Francisco Rivadulla, Wolfgang Parak, Silvia Barbosa y Pablo Taboada. *Synthesis, characterization and evaluation of magnetic doped ferrites as potential therapeutic tools*. VII Iberian Meeting of Colloids and Interfaces (Julio 2017: Madrid, España).
9. **Alberto Pardo**, Mateo Blanco, Beatriz Pelaz, Pablo del Pino, Francisco Rivadulla, Wolfgang Parak, Silvia Barbosa y Pablo Taboada. *Synthesis, characterization and evaluation of magnetic doped ferrites as potential biomedical and water purification tools*. IV Reunión de Jóvenes Investigadores en Coloides e Interfases. (Febrero 2018: Córdoba, España).
10. **Alberto Pardo**, Mateo Blanco, Beatriz Pelaz, Pablo del Pino, Francisco Rivadulla, Wolfgang Parak, Silvia Barbosa y Pablo Taboada. *Synthesis, characterization and evaluation of magnetic doped ferrites as potential biomedical and water purification tools*. VI Encontro da Mocidade Investigadora. (Mayo 2018: Santiago de Compostela, España).

iii) Capítulos de libros:

1. Ester Polo, Pablo del Pino, **Alberto Pardo**, Pablo Taboada y Beatriz Pelaz. *Nanooncology: Engineering Nanomaterials for Cancer Therapy and Diagnosis*. Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy and Bioimaging, Springer, 239-280 (2018).



Lista de abreviaturas

a	Longitud de un segmento de un copolímero
A	Constante de intercambio magnética
Abs	Absorbancia
AFM	Microscopía de fuerza atómica
As(III)	Arsenito
As(V)	Arsenato
b	Constante de adsorción de Langmuir
B	Inducción magnética
C	Concentración
ca.	Aproximadamente
C_e	Concentración de las disoluciones de metales pesados en equilibrio
C_{media}	Capacidad calorífica del medio de dispersión
C_{metal}	Concentración metálica
C_{MNPS}	Concentración de nanopartículas magnéticas
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
Co(acac)₂	Acetilacetato de cobalto
Co@MnMNPs	Nanopartículas magnéticas con núcleo de óxido de hierro dopado con cobalto y coraza de óxido de hierro dopada con manganeso
C_{PMA}	Concentración de poli(isobutileno-anhídrido maleico)
CT	Tomografía computacional
D	Diámetro hidrodinámico de las nanopartículas
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
D_C	Diámetro crítico
DLS	Dispersión dinámica de luz
D_M	Diámetro crítico de transición a régimen monodominio
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSA	Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico
DMSO	Dimetil sulfóxido
D_{NP}	Diámetro de la parte inorgánica de las nanopartículas
DOXO	Doxorrubicina
D_S	Diámetro crítico de transición a régimen superparamagnético
dT/dt	Pendiente de la curva de temperatura frente a tiempo
E₀	Demás contribuciones a la energía libre
E_B	Altura de la barrera de energía de anisotropía de una nanopartícula
e_C	Espesor de la coraza
E_D	Energía magnetostática
EDX	Dispersión de rayos X
E_e	Energía de intercambio magnético
E_H	Energía de Zeeman

E_K	Energía de anisotropía cristalina
f	Frecuencia
FAA	Ácido ferroceneacético
FBS	Suero fetal bovino
FC	Curva de enfriamiento con campo magnético aplicado
Fe(acac)₃	Acetilacetato de hierro
Fe₃O₄	Magnetita
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
G	Gauss
H	Campo magnético
H₂O	Agua
H_C	Campo magnético coercitivo
HEPES	Ácido 4-2-(hidroxietil)piperacina-1-etanosulfónico
HgO	Monóxido de mercurio
HRTEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
ICP-MS	Espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente
K	Constante de anisotropía
K_B	Constante de Boltzmann
K_{eff}	Constante de anisotropía efectiva
M	Magnetización
m_{1N}	Masa de un núcleo
M_{at}	Magnetización individual de un átomo
MFH	Hipertermia de fluidos magnéticos
m_N	Masa de los núcleos
Mn(acac)₂	Acetilacetato de manganeso
MNPs	Nanopartículas magnéticas
MPA	Imagen magneto-fotoacústica
MPI	Imagen por partículas magnéticas
M_R	Magnetización remanente
MRI	Imagen por resonancia magnética
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
M_S	Magnetización de saturación
MUS	Imagen por ultrasonidos-magnética
M_w	Peso molecular promedio en peso
N	Número de átomos que conforman una nanopartícula
N_p	Grado de polimerización
N_A	Número de Avogadro
NaCl	Cloruro de sodio
NPs	Nanopartículas
OA	Ácido oleico
OA_m	Oleilamina
P4VP	Poli-4-vinilpiridina
PBS	Solución salina tamponada con fosfato

PEG	Poli-etilenglicol
PET	Tomografía de emisión de positrones
PMA	Poli(isobutileno-anhídrido maleico)
PS	Poliestireno
PS-<i>b</i>-P4VP	Copolímero dibloque poliestireno- <i>b</i> -poli-4-vinilpiridina
PS-<i>b</i>-PI	Copolímero dibloque poliestireno- <i>b</i> -polisopreno
PSF	Medio fagolisosomal
QDs	Puntos cuánticos
Q_e	Cantidad de metales pesados adsorbida por unidad de masa de NPs
Q_m	Máxima capacidad de adsorción de las nanopartículas
R	Razón molar entre ácido oleico y acetilacetato de hierro
R₁	Tasa de relajación longitudinal
r₁	Coefficiente de relajación longitudinal
R₂	Tasa de relajación transversal
r₂	Coefficiente de relajación transversal
R_F	Distancia entre extremos de una cadena polimérica
RMN	Resonancia magnética nuclear
R_N	Radio de los núcleos
RNA	Ácido ribonucleico
ROI	Región de interés
SAED	Difracción de electrones de área seleccionada
SAR	Tasa de adsorción específica
SBB12	Disolución de borato de sodio en agua a pH12
SEM	Microscopía electrónica de barrido
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SMA	Enfoque supramolecular
SPECT	Tomografía computarizada de emisión de fotones
SPIONs	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro
SQUID	Dispositivo superconductor de interferencia cuántica
T	Temperatura
T₁	Tiempo de relajación longitudinal
T_{1,0}	Tiempo de relajación longitudinal sin agente de contraste
T₂	Tiempo de relajación transversal
T_{2,0}	Tiempo de relajación transversal sin agente de contraste
T_B	Temperatura de bloqueo
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
THF	Tetrahidrofurano
US	Ultrasonidos
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible
v/v	Concentración en porcentaje volumen/volumen
V_{1C}	Volumen de una coraza
V_C	Volumen de las corazas

V_N	Volumen de los núcleos
V_{NC}	Volumen de las estructuras núcleo-coraza
VSM	Magnetometría vibracional
V_{TC}	Volumen de la totalidad de las corazas
w/v	Concentración en porcentaje peso/volumen
X_C	Estequiometría del elemento X en la coraza
X_N	Estequiometría del elemento X en el núcleo
X_{NC}	Estequiometría del elemento X en la estructura núcleo-coraza
XRD	Difracción de rayos X
XRR	Reflectometría de rayos X
z	Parámetro de red en una estructura cúbica
ZFC	Curva de enfriamiento sin campo magnético
Zn(acac)₂	Acetilacetionato de zinc
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Hematita
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Maghemita
η	Viscosidad
μ_0	Permeabilidad magnética del vacío
μ_P	“Supermomento” de una partícula superparamagnética
ρ_{media}	Densidad del medio
ρ_{NPs}	Densidad de las nanopartículas
τ_B	Tiempo de relajación de Brown
τ_{eff}	Tiempo de relajación efectivo
τ_m	Tiempo de medición característico de una técnica experimental
τ_N	Tiempo de relajación de Néel
ν	Exponente de Flory
ϕ^*	Fracción de volumen de solapamiento entre cadenas polimérica
χ	Parámetro de Flory-Huggins

Lista de figuras

1.1	Orientación de los momentos magnéticos que dan lugar a las distintas formas de magnetismo/comportamiento magnético	1
1.2	Representación esquemática de los momentos magnéticos en la frontera entre dos dominios	3
1.3	Forma típica de un ciclo de histéresis en un material ferro- o ferrimagnético	4
1.4	Representación de la transición de un sistema mutidominio a monodominio al reducirse el tamaño del mismo por debajo de un valor crítico	6
1.5	Valores de tamaño crítico de la transición a régimen monodominio determinados teóricamente en diferentes sistemas de MNPs esféricas	7
1.6	Esquema de anisotropía magnética uniaxial y supermomento de una partícula y energía de anisotropía en función del ángulo entre el supermomento y el eje de anisotropía	8
1.7	Curva de campo coercitivo frente a tamaño de NP con diferentes regímenes y los tamaños críticos de monodominio y superparamagnetismo	9
1.8	Perfil típico de las curvas FC y ZFC en MNPs superparamagnéticas y determinación de la temperatura de bloqueo	11
1.9	Curva típica de magnetización frente a campo magnético aplicado de un material monodominio en régimen superparamagnético	12
1.10	Esquema del proceso de descomposición térmica una síntesis de MNPs	15
1.11	Representación esquemática del orden de los momentos magnéticos próximos a la superficie en MNPs esféricas de mayor y menor cristalinidad bajo la aplicación de un campo magnético externo	16
1.12	Representación esquemática de la ordenación de los momentos magnéticos próximos a la superficie en MNPs de forma cúbica y de forma esférica bajo la aplicación de un campo magnético externo	17
1.13	Estructura cristalina de espinela	19
1.14	Representación de los ciclos de histéresis de las partes de una estructura núcleo-coraza; potencia magnética de varias MNPs en función de su tamaño y composición; y potencia magnética de MNPs simples y con estructura núcleo-coraza en función del tamaño y de la constante de anisotropía	23
1.15	Representación esquemática de la conversión de momentos magnéticos a código binario en un sistema de almacenamiento de información	25
1.16	Representación esquemática de las diferentes etapas de un proceso de descontaminación de agua mediante adsorción usando MNPs	27
1.17	Representación esquemática de la separación selectiva de residuos metálicos industriales mediante su inmersión en un ferrofluido y aplicación de diferentes campos magnéticos y temperaturas	29

1.18	Representación de posibles escenarios para introducir MNPs inorgánicas en un medio biológico y esquemas de procesos de intercambio de ligando, recubrimiento polimérico y cápsula polimérica con MNPs en sus paredes	32
1.19	Representación gráfica de distintas métricas usadas para comparar las dosis	34
1.20	Representación esquemática de la construcción de nanoestructuras magnéticas cargadas con DOXO y curvas de liberación del fármaco	38
1.21	Representación gráfica de la magnetofección <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	40
1.22	Simulación teórica de los tiempos de relajación de Néel, Brown y efectivo en MNPs de FeCo y Fe ₃ O ₄ en función del tamaño de las mismas	43
1.23	Esquema del montaje experimental para medir el SAR y curvas de temperatura frente a tiempo en sistemas adiabáticos y no adiabáticos	46
1.24	Esquema de montaje MFH para modelos animales y evolución del tamaño del tumor en el animal tras los diferentes tratamientos mediante MFH y consiguiente liberación del fármaco DOXO	48
1.25	Esquema MRI: alineación de los espines nucleares de los núcleos ¹ H según el campo externo aplicado; variación de la magnetizaciones longitudinal (M _Z) y transversal (M _{XY}) tras irradiar con campo perpendicular al inicial; T ₁ es el tiempo que M _Z tarda en recuperar el 63% de su valor de equilibrio; T ₂ es el tiempo que M _{XY} tarda en caer al 37% de su valor inicial	50
1.26	Tiempos de relajación T ₁ y T ₂ de diferentes tejidos del cuerpo humano medidos tras la aplicación de un campo magnético de 1.5 T	51
1.27	Aumento de la magnetización de saturación y del coeficiente r ₂ al aumentar el tamaño de las MNPs, imágenes de MRI en T ₁ de SPIONs de 3 nm y gráfica de R ₁ frente a concentración de Fe en SPIONs de 12.0, 3.0 y 2.2 nm	53
1.28	a) MNPs de magnetita con el marcador fluorescente Cy5.5. b) Estructuras híbridas basadas en NPs sobreconversoras, MNPs y NPs de oro usadas como agentes de imagen óptico-MRI. c) MNPs de magnetita marcadas con radioisótopos ⁶⁴ Cu y el quelante DTCBP. d) MNPs marcadas con radioisótopos de ⁹⁹ Tc como agentes de imagen PET-MRI y SPECT-MRI	56
1.29	Ventajas y desventajas de la aplicación de forma individual de las técnicas de imagen PET, SPECT, CT, US, MR y óptica	57
1.30	Esquema de la estructura de los homopolímeros y los copolímeros	59
1.31	Diferentes tipos de copolímeros según la distribución de los monómeros: aleatorio, alternante, dibloque, tribloque e injertados	60
1.32	Representación esquemática de la constitución de vesículas y micelas al disolver copolímeros anfifílicos en disolventes selectivos	61
1.33	Diagramas de fases experimental y teórico del copolímero de bloque PS- <i>b</i> -PI y evolución de la conformación que adoptan los microdominios formados al variar la fracción entre bloques	64

1.34	Diferentes conformaciones que pueden adoptar los copolímeros de bloque en película delgada: microdominios lamelares y cilíndricos paralelos y perpendiculares a la superficie del sustrato y microdominios esféricos	65
1.35	Esquema de la síntesis de MNPs: copolímero en película delgada sin modificar y con sal de hierro unida a un bloque y sistema ordenado de MNPs tras reducir la sal de hierro y eliminar el polímero	67
1.36	Esquema de la preparación de películas delgadas mediante espín-coating	69
1.37	Esquema de la preparación de películas delgadas mediante dip-coating	70
2.1	Esquema del montaje experimental para la síntesis de MNPs cúbicas	95
2.2	Perfil de calentamiento en una síntesis típica de MNPs de morfología cúbica	96
2.3	Imagen TEM e histograma de distribución de tamaños de los nanocubos obtenidos en una síntesis típica	103
2.4	Difractograma de rayos X de las MNPs cúbicas resultantes de síntesis típica	104
2.5	Patrón de difracción SAED e imagen de HRTEM de las MNPs de morfología cúbica resultantes de la síntesis típica	105
2.6	Espectro FTIR de los nanocubos de 48.0 ± 4.0 nm recubiertos de ácido oleico obtenidos en la síntesis típica	107
2.7	Curva de calentamiento con los momentos de extracción de las alícuotas y variación del tamaño de las MNPs durante la reacción	108
2.8	Imágenes de TEM de las MNPs en diferentes momentos del proceso de síntesis: durante el calentamiento a 220 y 255 °C; e iniciado el tiempo de reacción a temperatura de reflujo tras 2, 7, 12, 17, 22, 26 y 30 min.	108
2.9	Imágenes de TEM de los nanocubos obtenidos tras la síntesis típica en presencia y ausencia de la etapa de vacío a 100 °C	110
2.10	Representación gráfica del tamaño de arista de los nanocubos de óxido de hierro obtenidos frente a la concentración de precursor ferroso implementada en las disoluciones precursoras	111
2.11	Imágenes de TEM de las MNPs obtenidas en síntesis con concentraciones de precursor ferroso de 269, 241, 200, 100, 80, 71, 56, 48 y 34 mM	112
2.12	Imágenes de TEM de nanocubos obtenidos tras tiempos de reacción de 15, 60 y 90 min. y gráfica del tamaño de las MNPs frente al tiempo de reacción	113
2.13	Imagen de TEM de los nanocubos obtenidos en una síntesis a una temperatura de reacción de 265 °C	114
2.14	Imágenes de TEM de las MNPs obtenidas tras síntesis con rampas de temperatura de 7, 10, 13 y 16 °C·min ⁻¹	115
2.15	Imagen HRTEM y patrón SAED de las MNPs octaédricas. Esquema de los ejes cristalinos de un octaedro e imágenes HRTEM de octaedros mostrados según sus proyecciones 2D con dibujos de las mismas	117

2.16	Imágenes de TEM de los sistemas de MNPs obtenidos con razones entre ácido oleico y precursor ferroso de $R = 1.5, 1.75, 2.5, 3.5, 4$ y 5	118
2.17	Imágenes TEM de los nanocubos de ca. 40 nm de composición $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.33}\text{Fe}_{2.67}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.71}\text{Fe}_{2.29}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{0.78}\text{Fe}_{2.22}\text{O}_4$	121
2.18	Imágenes TEM de los nanocubos de ca. 40 nm de composición $\text{Mn}_{0.04}\text{Fe}_{2.96}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.05}\text{Fe}_{2.95}\text{O}_4$ y $\text{Mn}_{0.02}\text{Fe}_{2.98}\text{O}_4$	121
2.19	Imágenes TEM de los nanocubos de ca. 40 nm de composición $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.28}\text{Fe}_{2.72}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.38}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.30}\text{Fe}_{2.70}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$	122
2.20	Imágenes TEM de nanocubos de ca. 30 nm de composición $\text{Co}_{0.27}\text{Fe}_{2.73}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.10}\text{Fe}_{2.90}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.28}\text{Fe}_{2.72}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.31}\text{Fe}_{2.69}\text{O}_4$	123
2.21	Estequiometrías de cobalto y zinc en los nanocubos, determinadas por ICP-MS, frente a las esperadas dadas las razones entre precursores magnéticos	125
2.22	Difractogramas de rayos X de los nanocubos de 30 nm de composición Fe_3O_4 , $\text{Zn}_{0.28}\text{Fe}_{2.72}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$; y de los nanocubos de 40 nm de composición Fe_3O_4 , $\text{Zn}_{0.18}\text{Fe}_{2.82}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{0.71}\text{Fe}_{2.29}\text{O}_4$	129
2.23	Nanocubos de composición $\text{Zn}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$ antes y después del proceso de recubrimiento polimérico y fotografía de los nanocubos en un tubo de ensayo con agua y hexano tras ser funcionalizados	131
2.24	Distribución estadística del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de ca. 40 nm de composición $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.33}\text{Fe}_{2.67}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.71}\text{Fe}_{2.29}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.78}\text{Fe}_{2.22}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.28}\text{Fe}_{2.72}\text{O}_4$	132
2.25	Distribución estadística del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de ca. 40 nm de composición $\text{Zn}_{0.38}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.30}\text{Fe}_{2.70}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.04}\text{Fe}_{2.96}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.05}\text{Fe}_{2.95}\text{O}_4$ y Fe_3O_4	133
2.26	Distribución estadística del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de ca. 30 nm de composición $\text{Co}_{0.27}\text{Fe}_{2.73}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.10}\text{Fe}_{2.90}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.28}\text{Fe}_{2.72}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.31}\text{Fe}_{2.69}\text{O}_4$ y Fe_3O_4	134
2.27	Distribución estadística del potencial ζ de los nanocubos de ca. 40 nm y composición $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$ y ca. 30 nm y composición $\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$	137
2.28	Espectro FTIR de los nanocubos de ca. 40 nm y composición $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$ funcionalizados con el complejo PMA-dodecilamina	138
2.29	Distribución del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en PBS tras 0-96 h	140
2.30	Distribución del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en PSF tras 0-96 h	141
2.31	Distribución del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en DMEM-glutamina-penicilina tras 0-96 h	141
2.32	Distribución del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en DMEM-glutamina-penicilina-FBS tras 0-96 h	142

2.33	Distribución del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en disoluciones de NaCl a 0.02, 0.10 y 0.20 M tras 0-96 h	143
2.34	Distribución del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en disoluciones de NaCl a 0.50, 1.50 y 2.50 M tras 0-96 h	144
2.35	Variación del tamaño hidrodinámico de los nanocubos con el tiempo de incubación en las diferentes disoluciones de NaCl en agua	145
2.36	Imágenes TEM de los nanocubos de óxido de hierro de 41.1 ± 3.1 y 48.0 ± 4.0 nm funcionalizados con DMSA	148
2.37	Distribución del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de óxido de hierro de tamaño 41.1 ± 3.1 y 48.0 ± 4.0 nm modificados con DMSA	149
2.38	Distribución estadística del potencial ζ y espectro FTIR de los nanocubos de óxido de hierro 48.0 ± 4.0 nm modificados con DMSA	150
2.39	Distribución del tamaño hidrodinámico de los cubos en HEPES tras 0-168 h	152
2.40	Distribución del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en DMEM-glutamina-penicilina-FBS tras 0-168 h	153
2.41	Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado de los nanocubos resultantes de la síntesis típica a diferentes temperaturas	156
2.42	Representaciones gráficas de la magnetización de saturación y el campo coercitivo frente a la temperatura de los nanocubos de 48.0 nm de magnetita	157
2.43	Curvas FC y ZFC de los nanocubos obtenidos en la síntesis típica	159
2.44	Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado de nanocubos de magnetita de diferentes tamaños	161
2.45	Representaciones gráficas de la magnetización de saturación y el campo coercitivo frente al tamaño de los nanocubos de magnetita	163
2.46	Curvas de magnetización frente al campo magnético aplicado a 5 K y a 300 K de los octaedros de 52.1 nm y de los cubooctaedros de 55.3 nm	164
2.47	Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado a 300 K de los nanocubos de ca. 30 nm y 40 nm dopados con cobalto	166
2.48	Representaciones gráficas de la magnetización de saturación y el campo coercitivo frente a la cantidad de cobalto en nanocubos de ca. 30 y 40 nm	167
2.49	Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado a 300 K de los nanocubos de ca. 30 nm y 40 nm dopados con zinc	170
2.50	Representaciones gráficas de la magnetización de saturación y el campo coercitivo frente a la cantidad de zinc en nanocubos de de ca. 30 y 40 nm	171
2.51	Representación gráfica de la magnetización remanente frente a la cantidad de zinc en los nanocubos dopados de 30 y 40 nm	172
2.52	Curvas de magnetización frente al campo magnético aplicado a 300 K de los nanocubos dopados con manganeso	174

3.1	Esquema del montaje experimental empleado para la síntesis de MNPs esféricas y de nanoestructuras núcleo-coraza	184
3.2	Perfiles de calentamiento en las síntesis típicas de MNPs esféricas y nanoestructuras núcleo-coraza	186
3.3	Imagen TEM, histograma de la distribución estadística de tamaños y difractograma de rayos X de las MNPs esféricas obtenidas en síntesis típica	193
3.4	Imagen TEM de las MNPs sintetizadas en ausencia de la etapa de vacío	194
3.5	Imágenes TEM de las MNPs sintetizadas bajo velocidades de calentamiento hasta la temperatura de reflujo de 10, 7 y 2 °C/min e histogramas de sus distribuciones estadísticas de tamaños	195
3.6	Imágenes TEM de las MNPs sintetizadas a concentraciones del precursor férrico de 83 y 300 mM e histogramas de sus distribuciones de tamaños	196
3.7	Representación gráfica del tamaño de las MNPs obtenidas frente a la concentración del precursor ferroso y a la rampa de temperatura	197
3.8	Imágenes TEM de las MNPs Fe_3O_4 , $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$	199
3.9	Imágenes TEM de las MNPs $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.12}\text{Mn}_{0.26}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.15}\text{Mn}_{0.55}\text{Fe}_{2.30}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$	200
3.10	Cantidades de reactivos empleadas, imágenes de TEM e histogramas de las distribuciones estadísticas de tamaños de las MNPs obtenidas en el ensayo de escalabilidad del proceso sintético	201
3.11	Estequiometrías de los elementos dopantes determinadas por ICP-MS frente a las esperadas dadas las razones entre precursores magnéticos utilizadas	202
3.12	Difractogramas de rayos X de las MNPs $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$	206
3.13	Imágenes TEM de las MNPs de composición $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ recubiertas con PMA-dodecilamina en medio acuoso	208
3.14	Distribución estadística del tamaño hidrodinámico de las MNPs Fe_3O_4 , $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$	209
3.15	Distribución estadística del tamaño hidrodinámico de las MNPs $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.12}\text{Mn}_{0.26}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.15}\text{Mn}_{0.55}\text{Fe}_{2.30}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$	210

3.16	Distribución estadística del potencial ζ de las MNPs Fe_3O_4 , $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$	213
3.17	Distribución estadística del potencial ζ de las MNPs de composición $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.12}\text{Mn}_{0.26}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.15}\text{Mn}_{0.55}\text{Fe}_{2.30}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$	214
3.18	Distribución del tamaño hidrodinámico de las MNPs en PBS tras 0-96 h	217
3.19	Distribución del tamaño hidrodinámico de las MNPs en PSF tras 0-96 h	217
3.20	Distribución del tamaño hidrodinámico de las MNPs en DMEM-glutamina tras 0- 96 h	218
3.21	Distribución del tamaño hidrodinámico de las MNPs en DMEM-glutamina-penicilina tras 0- 96 h	218
3.22	Distribución del tamaño hidrodinámico de las MNPs en DMEM-glutamina-penicilina-FBS tras 0- 96 h	219
3.23	Distribución del tamaño hidrodinámico de las MNPs en disoluciones salinas de concentración 0.01, 0.02 y 0.05 M tras 0-72 h de incubación	220
3.24	Distribución del tamaño hidrodinámico de las MNPs en disoluciones salinas de concentración 0.10, 0.20 y 0.50 M tras 0-72 h de incubación	221
3.25	Distribución del tamaño hidrodinámico de las MNPs en disoluciones salinas de concentración 1.00, 1.50 y 2.50 M tras 0-72 h de incubación	222
3.26	Variación del tamaño hidrodinámico de las MNPs con el tiempo en disoluciones salinas con concentraciones en el rango de 0.01 M a 2.50 M	223
3.27	Imagen de TEM, histograma de tamaños y difractograma de rayos X de las Co@Mn MNPs obtenidas en la síntesis típica	227
3.28	Imágenes de TEM e histogramas de tamaños de los núcleos óxido de hierro dopados con cobalto de 5.23, 7.50 y 13.42 nm	228
3.29	Esquema de los tamaños de núcleo y coraza de las MNPs sintetizadas	230
3.30	Imágenes TEM de las MNPs con diámetro núcleo - espesor coraza de 5.23-1.88, 5.23-3.63, 7.50-1.49, 7.50-3.53, 7.50-5.11, 7.50-6.50 y 13.42-1.75 nm	231
3.31	Imágenes de TEM de los ensayos de crecimientos de corazas de alto espesor sobre núcleos de 13.42 nm con problemas de nucleación	232
3.32	Imágenes de TEM de las Co@Mn MNPs con diámetro de núcleo - espesor de coraza de 7.50-1.49 y 13.42-1.75 con nucleación colateral antes y después de eliminar el material nucleado	234
3.33	Representación gráfica del porcentaje de incorporación de manganeso a las corazas frente a la razón entre los volúmenes de coraza y núcleo	236

3.34	Imágenes de TEM de las estructuras núcleo-coraza NPs1 y NPs2	238
3.35	Difractogramas de rayos X de las Co@MnMNPs con núcleo de 7.50 nm y corazas de 1.50 y 6.50 nm	240
3.36	Distribución estadística del tamaño hidrodinámico de las Co@MnMNPs con diámetro de núcleo - espesor de coraza de 5.23-1.88, 5.23-3.63, 7.50-1.49, 7.50-3.53, 7.50-5.11, 7.50-6.50 y 13.42-1.75 nm; y de las estructuras núcleo-coraza NPs1 y NPs2	242
3.37	Representación gráfica de los tamaños hidrodinámicos frente a los tamaños medidos en las imágenes de TEM de las Co@MnMNPs	243
3.38	Distribución estadística del potencial ζ de las Co@MnMNPs con diámetro de núcleo - espesor de coraza de 5.23-1.88, 5.23-3.63, 7.50-1.49, 7.50-3.53, 7.50-5.11, 7.50-6.50 y 13.42-1.75 nm; y de las estructuras NPs1 y NPs2	245
3.39	Ciclos de histéresis magnética a 10 y 300 K de las MNPs de composición Fe_3O_4 , $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.69}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$, $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$	248
3.40	Ciclos de histéresis magnética a 10 y 300 K de las MNPs de composición $\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$	249
3.41	Curvas FC y ZFC de las MNPs de composición Fe_3O_4 , $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$, $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$, $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$	250
3.42	Curvas FC y ZFC de las MNPs de composición $\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$	251
3.43	Representaciones gráficas de las magnetizaciones de saturación a 10 y 300 K frente a las estequiometrías de Zn, Co y Mn	256
3.44	Representaciones gráficas de los campos magnéticos coercitivos a 10 K frente a las estequiometrías de Zn, Co y Mn	257
3.45	Mapas de color del campo coercitivo a 10 K en función de las estequiometrías de Co-Mn y Co-Zn	264
3.46	Mapas de color de las saturaciones a 10 y 300 K en función de las estequiometrías de Zn-Co y Zn-Mn	264
3.47	Ciclos de histéresis a 10 y 300 K y curvas FC y ZFC de las MNPs de óxido de hierro dopadas con cobalto de diámetro 5.23, 7.50 y 13.42 nm	266
3.48	Ciclos de histéresis a 10 y 300 K de las Co@MnMNPs con diámetro de núcleo - espesor de coraza de 5.23-1.88, 5.23-3.63, 7.50-1.49, 7.50-3.53, 7.50-5.11, 7.50-6.50 y 13.42-1.75 nm	267

3.49	Curvas FC-ZFC de las Co@MnMNPs con diámetro de núcleo-espesor de coraza de 5.23-1.88, 5.23-3.63, 7.50-1.49, 7.50-3.53, 7.50-5.11, 7.50-6.50 y 13.42-1.75 nm	268
3.50	Representaciones gráficas de las magnetizaciones de saturación frente al volumen relativo de la coraza a 10 y 300 K	270
3.51	Representación gráfica del campo coercitivo a 10 K frente al volumen relativo de la coraza y mapa de color del campo coercitivo a 10 K en función de los tamaños de núcleo y coraza	272
3.52	Ciclos de histéresis a 10 y 300 K y curvas FC-ZFC de las Co@MnMNPs de 13.42-1.75 nm con nucleación de materiales precursores de la coraza	272
3.53	Imágenes aumentadas en las zonas dónde se produce una inflexión de las curvas de magnetización frente a campo magnético de las Co@MnMNPs de 13.42-1.75 nm antes y tras eliminar el material nucleado	274
4.1	Esquemas de la unión del FAA con el P4VP y de la estructura de las micelas de PS- <i>b</i> -P4VP en un disolvente selectivo para los bloques de PS	283
4.2	Esquema del montaje utilizado para someter las películas delgadas a una atmósfera saturada de vapores de dioxano en recipiente sellado	285
4.3	Esquema de las diferentes etapas del proceso de síntesis de los sistemas ordenados de MNPs de óxido de hierro en película delgada	286
4.4	Representación esquemática de las diferentes variables sintéticas estudiadas en la optimización del proceso de preparación de las películas delgadas	288
4.5	Imágenes SEM de películas delgadas preparadas en tolueno:THF y en dioxano expuestas a tiempos de plasma de O ₂ de 5 y 10 min.	289
4.6	Imágenes SEM de películas delgadas preparadas a temperaturas de mezcla de las disoluciones de PS- <i>b</i> -P4VP y FAA de 75, 80, 85, 90 y 95 °C	291
4.7	Imágenes SEM de películas delgadas preparadas tras temperaturas de reacción de las disoluciones precursoras de 25 y 80 °C	293
4.8	Imágenes SEM de muestras sometidas a atmósfera de dioxano o vacío primario de 100 mbar, sin tratamiento posterior, a razón molar P4VP/FAA de 1/0.25, 1/0.50, 1/1.00, 1/2.50 y 1/4.00	296
4.9	Imágenes SEM de muestras sometidas a atmósfera de dioxano o vacío primario de 100 mbar y plasma de oxígeno a razón molar P4VP/FAA de 1/0.25, 1/0.50, 1/1.00, 1/2.50 y 1/4.00	299
4.10	Imágenes SEM de muestras sometidas a atmósfera de dioxano calcinadas a 450 °C a razón molar P4VP/FAA de 1/0.25, 1/0.50, 1/1.00, 1/2.50 y 1/4.00	301
4.11	Imágenes SEM de muestras sometidas a atmósfera de dioxano calcinadas a 525 °C a razón molar P4VP/FAA de 1/0.25, 1/0.50, 1/1.00, 1/2.50 y 1/4.00	302
4.12	Imágenes SEM de muestras sometidas a atmósfera de dioxano calcinadas a 600 °C a razón molar P4VP/FAA de 1/0.25, 1/0.50, 1/1.00, 1/2.50 y 1/4.00	302

4.13	Imágenes SEM de muestras dañadas tras ser calcinadas a 1000 °C	304
4.14	Imágenes SEM de las películas delgadas analizadas mediante dispersión de rayos X: razón 1/0.25 irradiada con plasma de oxígeno, razón 1/0.50 calcinada a 450 °C y razón 1/4.00 irradiada con plasma de oxígeno	306
4.15	Espectros de EDX de las películas delgadas a razón molar 1/0.25 tratada en atmósfera de dioxano y plasma de oxígeno; a razón molar 1/0.50 tratada en atmósfera de dioxano y calcinada a 450 °C; y a razón molar 1/4.00 tratada en atmósfera de dioxano y plasma de oxígeno	307
4.16	Espectros de XRD de las películas delgadas a razón 1/0.25 y 1/4.00 irradiada con plasma de oxígeno y a razón 1/0.50 calcinada a 450 °C	310
4.17	Espectros de XRD de las películas delgadas preparadas mediante espín-coating múltiple a razón 1/0.25 irradiada con plasma de oxígeno, a razón 1/0.50 calcinada a 450 °C y a razón 1/4.00 irradiada con plasma de oxígeno	311
4.18	Posiciones típicas de los picos de difracción asociados a los planos cristalinos en los espectros de difracción de rayos X de hematita, maghemita y magnetita; y valores numéricos de las posiciones de los picos de difracción del óxido de hierro en forma de hematita	312
4.19	Curvas de XRR de las películas delgadas preparadas mediante la técnica de espín-coating a razón 1/0.25 irradiada con plasma de oxígeno, a razón 1/0.50 calcinada a 450 °C y a razón 1/4.00 irradiada con plasma de oxígeno	313
4.20	Muestra preparada por espín-coating múltiple obtenida a una razón 1/0.25 irradiada con plasma de oxígeno: perfil de espesores, histograma y valor medio de los espesores medidos e imagen AFM	315
4.21	Muestra preparada por espín-coating múltiple obtenida a una razón 1/0.50 calcinada a 450 °C: perfil de espesores, histograma y valor medio de los espesores medidos e imagen AFM	316
4.22	Muestra preparada por espín-coating múltiple obtenida a una razón 1/4.00 irradiada con plasma de oxígeno: perfil de espesores, histograma y valor medio de los espesores medidos e imagen AFM	316
4.23	Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado a 5 y 300 K de la muestra preparada mediante la técnica de espín-coating a una razón P4VP-FAA 1/0.50 sometida a atmósfera de dioxano y calcinada a 450 °C	318
5.1	Curvas de calentamiento de los distintos nanocubos de ca. 30 nm y 40 nm bajo la aplicación de un campo magnético alterno	333
5.2	Valores de SAR de los nanocubos frente al grado de dopaje	336
5.3	Valores de SAR de los nanocubos frente a las magnetizaciones de saturación y a los campos coercitivos a 300 K	338
5.4	Mapas de color del SAR en función de las estequiometrías de Zn-Co y de las magnetizaciones de saturación y los campos coercitivos a 300 K en los nanocubos de ca. 40 nm	339

5.5	Curvas de calentamiento de las MNPs esféricas bajo la aplicación de un campo magnético alterno	341
5.6	Determinación de la pendiente de la curva de temperatura durante los primeros segundos de calentamiento en las MNPs esféricas	341
5.7	Valores de SAR frente al diámetro de las MNPs esféricas	344
5.8	Variación del SAR frente a la estequiometría de Mn, Co y Zn en las MNPs esféricas	345
5.9	Dependencia del SAR con las magnetizaciones de saturación y el campo coercitivo en las MNPs esféricas	346
5.10	Variación del SAR en las ferritas esféricas frente al producto del campo coercitivo por la magnetización de saturación a 10 K y mapa de color del SAR en función de ambas magnitudes	348
5.11	Representación gráfica de los valores de SAR normalizados obtenidos en las nanoesferas de ca. 8.50 nm y en los nanocubos de ca. 30 y 40 nm	350
5.12	Tasas de relajación transversales frente a concentración de las disoluciones de nanocubos $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ y ajuste lineal	355
5.13	Tasas de relajación transversales frente a concentración de las disoluciones de MNPs $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ y Fe_3O_4 y ajustes lineales	358
5.14	Valores de r_2 en función del diámetro de las MNPs esféricas	360
5.15	Variación de r_2 frente a la estequiometría de los dopantes; y frente al campo coercitivo a 10 K y a las magnetizaciones de saturación a 10 y 300 K	361
5.16	Mapa de color de r_2 en función de del campo coercitivo y la magnetización de saturación a 10 K	363
5.17	Valores de SAR y r_2 medidos en los distintas ferritas esféricas dopadas	365
5.18	Viabilidad celular tras 6 y 24 h de incubación de los nanocubos $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$ en células HeLa y RAW 264.7	368
5.19	Viabilidad celular tras 6 y 24 h de incubación de las nanoesferas $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$ en células HeLa y RAW 264.7	370
5.20	Viabilidad celular tras 6 y 24 h de incubación de los nanocubos de magnetita recubiertos con DMSA en células HeLa y MDA-MB-231	372
5.21	Imágenes de microscopía óptica de los nanocubos de composición $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$ en células HeLa tras 6 y 24 h de incubación	374
5.22	Imágenes de microscopía confocal de células HeLa con nanocubos de ca. 40 nm funcionalizados con DMSA tras 24 h de incubación	376
5.23	Ciclos de histéresis a 300 K de los nanocubos de ca. 40 nm $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$ en agua y en el interior de células HeLa	378
5.24	Curvas de calentamiento de los nanocubos de ca. 40 nm internalizados en células HeLa bajo la aplicación de un campo magnético alterno	382

5.25	Imágenes de TEM, histogramas de tamaños, y distribuciones del tamaño hidrodinámico de las MNPs usadas en ensayos de biorremediación_____	387
5.26	Cantidad de As(III) eliminado frente a la concentración del mismo utilizando las MNPs Fe_3O_4 , $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$ _____	389
5.27	Cantidad de As(III) eliminado frente a la concentración del mismo, empleando las distintas MNPs en disoluciones de pH 3.0, 5.5, 7.4 y 10.0_____	390
5.28	Porcentaje de As(III) eliminado frente a la concentración del mismo utilizando las MNPs Fe_3O_4 , $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$ _____	392
5.29	Cantidad de HgO eliminado frente a la concentración del mismo utilizando las MNPs Fe_3O_4 , $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$ _____	394
5.30	Cantidad de HgO eliminado frente a la concentración del mismo, empleando las distintas MNPs en disoluciones de pH 3.0, 5.5, 7.4 y 10.0_____	395
5.31	Porcentaje de HgO eliminado frente a la concentración del mismo utilizando las MNPs Fe_3O_4 , $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$ _____	396
5.32	Cantidades de As(III) y HgO eliminadas frente a la concentración de los mismos utilizando MNPs de composición Fe_3O_4 _____	398
5.33	Porcentajes de As(III) y HgO eliminado frente a las concentraciones de los mismos utilizando MNPs de composición Fe_3O_4 _____	399
5.34	Modelización del proceso de adsorción según la isoterma de Langmuir en los ensayos de eliminación de As y Hg_____	404
5.35	Cinéticas de adsorción de contaminantes en disoluciones acuosas de As(III) a pH 10 y de HgO a pH 5.5_____	407
5.36	Representaciones gráficas de los datos de las cinéticas de adsorción en función de los modelos cinéticos de primer y segundo orden_____	410

Lista de tablas

1.1	Tamaños críticos de monodominio en NPs de hierro, cobalto y níquel, y magnitudes que intervienen en el cálculo de los mismos	6
1.2	Tamaños críticos de monodominio y del estado superparamagnético de diferentes sistemas magnéticos	9
1.3	Valores de intensidad, frecuencia del campo magnético y producto de ambas magnitudes en mediciones del SAR en estudios de hipertermia magnética	45
2.1	Densidad superficial de monómeros de PMA implementada en funcionalizaciones para que los nanocubos sean estables en función de su tamaño	99
2.2	Protocolo de variación del campo magnético para la obtención de los ciclos de histéresis de los sistemas de MNPs cúbicas	103
2.3	Cantidades de reactivos utilizadas en las síntesis con diferentes concentraciones de precursor ferroso y tamaño de los nanocubos resultantes	111
2.4	Cantidades de precursores magnéticos empleadas, tamaño y composición de los nanocubos de ca. 40 nm	120
2.5	Cantidades de precursores magnéticos empleadas, tamaño y composición de los nanocubos de ca. 30 nm	123
2.6	Porcentajes de incorporación promedios de cobalto, zinc y manganeso a la estructura de los nanocubos en las síntesis efectuadas	126
2.7	Valores promedio de los tamaños hidrodinámicos de los nanocubos obtenidos	135
2.8	Valores promedio del diámetro hidrodinámico de los nanocubos de ca. 40 nm y composición $Zn_{0.21}Fe_{2.79}O_4$ en los diferentes medios biológicos ensayados	142
2.9	Valores promedio del diámetro hidrodinámico de los nanocubos de ca. 40 nm y composición $Zn_{0.21}Fe_{2.79}O_4$ en las disoluciones acuosas de NaCl	145
2.10	Valores promedio del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de óxido de hierro de 48.0 ± 4.0 nm funcionalizados con DMSA en medios biológicos	153
2.11	Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos estudiados a cada temperatura	156
2.12	Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos de magnetita de diferentes tamaños a 300 K	161
2.13	Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos dopados con cobalto	166
2.14	Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos dopados con zinc	170
2.15	Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos dopados con manganeso	174

3.1	Densidad superficial de monómeros de PMA implementada en el proceso de funcionalización para que las MNPs sean estables en función de su tamaño	188
3.2	Protocolo de variación del campo magnético para la obtención de los ciclos de histéresis de los sistemas de MNPs	191
3.3	Concentraciones de precursor férrico ensayadas y tamaño de las MNPs resultantes	196
3.4	Cantidades de precursores de hierro, cobalto, manganeso y zinc empleadas en las síntesis, tamaño y composición de las diferentes MNPs obtenidas	198
3.5	Porcentajes promedios de incorporación de los elementos dopantes cobalto, zinc y manganeso a la estructura de las MNPs	203
3.6	Porcentajes promedios de incorporación de los elementos dopantes a la estructura de las MNPs en función del tipo de dopaje ensayado	204
3.7	Valores promedio de los tamaños hidrodinámicos de las diferentes MNPs	211
3.8	Valores promedio del potencial ζ de las diferentes MNPs	215
3.9	Valores promedio del diámetro hidrodinámico de las MNPs en los diferentes medios biológicos ensayados a los diferentes tiempos de incubación	223
3.10	Valores promedio del diámetro hidrodinámico de las MNPs en disoluciones de NaCl de diferente concentración a los diferentes tiempos de incubación	224
3.11	Cantidades de precursores empleados, tamaños y composiciones de los núcleos de óxido de hierro dopados con cobalto sintetizados	227
3.12	Tamaños de núcleo y espesores de coraza de las Co@MnMNPs obtenidas, masas de núcleos añadidas para las síntesis, y espesores de coraza esperados	231
3.13	Composiciones de núcleos y corazas en los sistemas de Co@MnMNPs	235
3.14	Cantidades de precursores magnéticos de los núcleos y de las corazas empleados en las síntesis de NPs 1 y NPs 2	237
3.15	Masas de núcleos añadidas para las síntesis, y espesores de coraza esperados y obtenidos en las estructuras núcleo-coraza de NPs 1 y NPs 2	238
3.16	Composiciones de núcleos y corazas determinadas mediante ICP-MS en las estructuras núcleo-coraza NPs 1 y NPs 2	239
3.17	Valores promedio de los tamaños hidrodinámicos de las diferentes partículas núcleo-coraza y de sus diámetros en fase orgánica	243
3.18	Valores promedio del potencial zeta en los nanosistemas núcleo-coraza	246
3.19	Valores de las magnetizaciones de saturación a 10 y 300 K y de los campos coercitivos a 10 K de las diferentes sistemas de MNPs dopadas	252
3.20	Valores de las magnetizaciones de saturación a 10 y 300 K y de los campos coercitivos a 10 K de los diferentes sistemas con estructura núcleo-coraza	269
4.1	Presencia porcentual de los diferentes elementos detectados en las muestras analizadas mediante dispersión de rayos X	308

4.2	Porcentajes atómicos de Fe y O en las muestras analizadas mediante EDX, razón entre los mismos y composición estimada de las MNPs	309
4.3	Espesores de las tres películas delgadas analizadas, obtenidos mediante XRR	314
5.1	Protocolo de variación del campo magnético para la obtención de los ciclos de histéresis de los sistemas de MNPs internalizados en células	331
5.2	Valores de SAR medidos en los nanocubos de ca. 30 y 40 nm	334
5.3	Valores de SAR medidos en las MNPs esféricas de ca. 8.50 nm de diámetro	342
5.4	Valores de las tasas de relajación transversal medidos en cada concentración de nanocubos ensayada	354
5.5	Valores de los coeficientes de relajación r_2 de los sistemas de nanocubos	355
5.6	Valores de las tasas de relajación transversal medidos en cada concentración de MNPs esféricas ensayada	358
5.7	Valores de los coeficientes de relajación r_2 en los sistemas de MNPs esféricas	359
5.8	Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de las MNPs de ca. 40 nm antes y después de su internalización en células HeLa	379
5.9	Valores de SAR de los nanocubos antes y tras su internalización en células	382
5.10	Composición, tamaño en las imágenes de TEM y tamaño hidrodinámico de las MNPs empleadas en los ensayos de depuración de metales pesados	388
5.11	Coeficientes de correlación y valores de los parámetros de ajuste a la isoterma de Langmuir en los ensayos de eliminación de metales pesados	404
5.12	Tiempos de incubación ensayados en los estudios de las cinéticas de adsorción de As(III) y HgO sobre la superficie de las MNPs	407
5.13	Coeficientes de correlación y valores de los parámetros de ajuste al modelo cinético de segundo orden de los ensayos de las cinéticas de adsorción	410



Agradecimientos

A Silvia, Pablo, Víctor.

A Bea, del Pino, Ester, Gerardo, Rivadulla, Bañobre, Yolanda, Susana, Rivas, Antonio, Raquel, María José.

A Mateo, Eva María, Topete, Leal, Josué, Adriana, Javier, María, Olgiati, Sonia, Mehdi, Rahime, Encinas, Ibarra, Benedini, Bertolino, Pujales, Raquel, Edgar, Alatorre, Toyis, Iago, Aragón, Vicente, Ramón, Malpica, Ángel Daniel.

A Anna, Dani, Atif, Planas, Ana, Lin, Xing, Neus, Pietro, Parak.

Por último, mencionar que esta Tesis Doctoral fue realizada bajo el amparo de la beca/contrato de Formación de Personal Universitario FPU13/01890, los proyectos de investigación nacionales MAT2013-40971-R y MAT 2016-80266-R (Ministerio de Economía e Innovación), todos estos proyectos financiados parcialmente con fondos FEDER, y la ayuda GPC2015-007 de la Xunta de Galicia para Grupos de potencial Crecimiento.

El autor declara que el presente trabajo doctoral no presenta ningún tipo de conflicto de interés.



Resumen

La nanotecnología se define como la disciplina que se dedica al diseño, producción y caracterización a escala sub-micrométrica de materiales orgánicos e inorgánicos, estructuras, dispositivos y sistemas, permitiendo un control preciso sobre su forma, tamaño y propiedades físico-químicas. Richard Feynman, premio Nobel de Física en 1965, fue el primero en hacer referencia a las posibilidades de manipular la materia a escala nanométrica en su célebre conferencia en Caltech (Instituto Tecnológico de California) en diciembre de 1959 titulada “Al fondo hay espacio de sobra” (*“There is Plenty of Room at the Bottom”*). Desde aquel entonces, y muy especialmente en las últimas tres décadas, el estudio de sistemas de estas dimensiones ha dado lugar a un nuevo campo de investigación conocido como nanociencia, dentro del cual se incluye la nanotecnología. En dicho campo se entroncan diferentes ramas del conocimiento como, por ejemplo, la física, la química, la biología, la óptica o la electrónica; y ha supuesto un importante salto cualitativo, por ejemplo, en la ciencia de materiales, dado que ha posibilitado el control y la manipulación de la materia y de sus propiedades en dicha escala reducida. Los grandes avances experimentados han sido posibles gracias a la cada vez más sofisticada instrumentación existente y al interés suscitado por este tipo de nanosistemas, puesto que cuentan con una serie de propiedades únicas y un gran abanico de posibles aplicaciones tecnológicas.

Las propiedades de estos nuevos materiales nanométricos son, en muchos casos, completamente diferentes a las de los materiales macroscópicos, motivo por el cual el estudio de sus características requiere de una revisión de los conceptos básicos asociados a varias disciplinas como la física del estado sólido, la óptica o el magnetismo. Por otra parte, las potenciales aplicaciones de este tipo de materiales son tan amplias como el número de disciplinas que abarcan, pudiendo citar entre las más destacadas el (bio)diagnóstico, la terapia de enfermedades o la fabricación de dispositivos nano(opto)electrónicos. Además, los materiales nanoestructurados se caracterizan por presentar un importante porcentaje de sus átomos constituyentes en la superficie libre (esto es, poseen una elevada relación superficie/volumen) lo que hace que presenten un elevado potencial de reacción. Debido a esta característica, se presentan como potenciales agentes en aplicaciones relacionadas, por ejemplo, con la unión de otros compuestos a su superficie, tales como la eliminación de contaminantes o la catálisis química.

Dentro de los diferentes nanomateriales sintetizados hasta el momento, aquellos basados en nanopartículas magnéticas (MNPs) se encuentran entre los más interesantes. Esto se debe, fundamentalmente, a la posibilidad de inducir en estas partículas nanoscópicas un momento magnético y a su fácil direccionamiento mediante la simple aplicación de un campo magnético externo. Estas características convierten a este tipo de nanosistemas en candidatos prometedores para su uso en diferentes aplicaciones, que pueden abarcar desde los campos de la electrónica, la ingeniería y la óptica hasta alcanzar áreas más complejas como la biomedicina, dónde se emplean MNPs para el diagnóstico, la liberación controlada de fármacos unidos, inmovilización de agentes bioactivos, separación magnética de entidades biológicas y/o magnetotermia bajo la aplicación de campos magnéticos externos.

En concreto, las MNPs basadas en óxidos de hierro (en sus tres fases cristalinas principales: magnetita, maghemita y hematita) resultan particularmente adecuadas para varias de las aplicaciones antes mencionadas debido, entre otras características, a su baja toxicidad y a su elevada potencia magnética. Las propiedades de las MNPs dependen fuertemente de su morfología, cristalinidad, composición y recubrimiento de su superficie libre, pero el tamaño es, sin duda, el factor más influyente que define su comportamiento, existiendo unas dimensiones críticas por debajo de las cuales este tipo de nanosistemas entran en el llamado régimen superparamagnético. En este, las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado de las MNPs presentan un ciclo de histéresis con un área despreciable, lo cual a efectos prácticos se traduce en una muy baja tendencia a la formación de agregados de partículas al aplicar un campo magnético, condición de capital importancia en gran parte de sus aplicaciones. Es por ello que las investigaciones presentes se centran en la obtención de MNPs de elevada potencia magnética sin que esto conlleve un aumento importante en sus dimensiones. Entre las principales estrategias para lograrlo se encuentran la modificación su morfología, el crecimiento de corazas magnéticas alrededor del corazón o núcleo de la partícula, o la modificación de su composición mediante la introducción en su estructura cristalina de otros elementos metálicos (dopantes).

Entre las diferentes técnicas sintéticas físicas y químicas existentes para la preparación y obtención de MNPs, la descomposición térmica es la que proporciona un mayor control sobre las características y propiedades de las partículas obtenidas. Sus principales inconvenientes son la producción de una escasa cantidad de material

magnético en cada proceso sintético y, fundamentalmente, la obtención de MNPs que presentan un recubrimiento muy hidrófobo, lo que exige una modificación superficial posterior de cara a la transferencia de estos nanosistemas a medio acuoso, condición indispensable para todo tipo de aplicación biomédica.

La presente Tesis Doctoral consta de un total de seis capítulos. En el primero de ellos, se realiza una introducción sobre diferentes cuestiones relacionadas con el magnetismo, centrandose principalmente sobre los materiales en la escala nanométrica. En los siguientes cuatro capítulos, se explica cómo se han sintetizado varios sistemas magnéticos nanoestructurados de diferentes características en cuanto a sus dimensiones, morfologías, composiciones y recubrimientos. Posteriormente, estos nanosistemas fueron caracterizados en detalle a nivel estructural y físico, analizando la variación de sus propiedades al modificar sus características físico-químicas; así como su estabilidad coloidal bajo distintas condiciones simulando el entorno fisiológico y su comportamiento en medios biológicos modelo *in vitro* (cultivos celulares). Por último, se analizó la potencial aplicabilidad de los nanomateriales magnéticos obtenidos en diversas áreas, fundamentalmente en los campos de la biomedicina y el tratamiento de medios acuosos contaminados con metales pesados. En el último capítulo se exponen las conclusiones obtenidas durante el desarrollo del trabajo.

Así, en el Capítulo 1 se elaboró una breve explicación de las diferentes formas de magnetismo que se pueden dar en los materiales, con especial atención al fenómeno de los ciclos de histéresis en las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado. Además, se estudió en detalle el fenómeno del superparamagnetismo, analizando su origen físico y las características y propiedades de los materiales en este régimen magnético. A continuación, se llevó a cabo una detallada explicación de varios aspectos de las MNPs, empezando por los diferentes métodos sintéticos existentes y sus ventajas y desventajas de cara a la obtención sencilla, rápida y económica de nanosistemas magnéticos de las características deseadas. Se explicó de forma exhaustiva cómo afecta la modificación de distintas características estructurales de las MNPs a sus propiedades físicas, centrandose este análisis en la influencia de la cristalinidad, del grado de dopaje, de la morfología o del crecimiento de corazas magnéticas a su alrededor. Se revisaron también varias de las aplicaciones de las MNPs, dividiendo estas en dos grandes bloques: tecnológicas y biomédicas. Dentro de las aplicaciones tecnológicas se detallaron el modo de empleo y las distintas características

y propiedades que deben presentar las MNPs de cara a su empleo en procesos como, por ejemplo, el almacenamiento de información en soporte magnético o la descontaminación de medios acuosos contaminados mediante la adsorción de los agentes contaminantes en la superficie de las nanoestructuras magnéticas. En cuanto a las aplicaciones biomédicas, por su parte, se abordaron los diferentes procesos de modificación superficial a los que pueden ser sometidas las MNPs, así como las métricas adecuadas para medir las dosis empleadas, de cara a su aplicación en la denominada hipertermia magnética, el transporte y liberación de fármacos, la imagen por resonancia magnética o la imagen multimodal, entre otras. Finalmente, en este Capítulo se analizaron las propiedades de los copolímeros de bloque, centrando la explicación en su comportamiento al ser disueltos en disolventes selectivos y en el origen de su nanoestructuración en la forma de microdominios al ser preparados en la forma de películas delgadas. A continuación, se detalló como esta última característica puede ser aprovechada para la utilización de estos compuestos como patrones para la obtención de sistemas ordenados de MNPs con orden nanoscópico sobre áreas micro-/macroscópicas, así como las principales técnicas existentes para la preparación de las mencionadas películas delgadas y sus ventajas e inconvenientes más destacados.

En el Capítulo 2 se trata la síntesis de MNPs de óxido de hierro con morfología cúbica a través de la técnica de descomposición térmica. Mediante la modificación de diversos parámetros del proceso sintético, tales como la concentración de precursores, el tiempo y la temperatura de reacción, el ritmo de incremento de temperatura o la razón entre las cantidades de precursores metálicos y agentes estabilizantes, se consiguieron MNPs cúbicas con tamaños comprendidos en el rango de 25 a 100 nm y con un elevado grado de monodispersidad, así como nanosistemas con otras morfologías distintas como octaedros y cubooctaedros. Asimismo, por medio de la sustitución parcial del precursor férrico empleado por los precursores de otros elementos metálicos como manganeso, cobalto o zinc, se obtuvieron MNPs de con distintos grados de dopaje. A continuación, se realizó un análisis en profundidad de las características estructurales de las diferentes MNPs cúbicas obtenidas mediante técnicas experimentales como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), difracción de electrones de área seleccionada (SAED), difracción de rayos X (XRD), espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) o espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). También se

analizaron en detalle los diferentes grados de incorporación de los tres elementos dopantes ensayados y su disposición en las distintas posiciones cristalográficas de la estructura de las MNPs. La caracterización magnética de las partículas, por su parte, se llevó a cabo mediante medidas de magnetometría vibracional (VSM), focalizándose el estudio en la influencia de la temperatura, el tamaño de las MNPs y, principalmente, los grados de dopaje de las mismas sobre sus ciclos de histéresis a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a cabo la transferencia de varios de los nanosistemas magnéticos sintetizados a medio acuoso mediante dos protocolos alternativos: un proceso de recubrimiento con el polímero poli(isobutileno-anhídrido maleico) (PMA) modificado con dodecilamina, y un proceso de intercambio de ligando utilizando ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), analizándose la correcta funcionalización de las MNPs mediante la determinación de carga eléctrica superficial a través de la técnica de velocimetría Doppler. Se analizaron, por último, los grados de agregación inducidos en las MNPs tras cada recubrimiento y la estabilidad de estas a diferentes tiempos de incubación en varios medios biológicos relevantes de interés por medio de medidas de dispersión dinámica de luz (DLS).

En el Capítulo 3 se sintetizaron, de nuevo mediante descomposición térmica, MNPs de óxido de hierro de morfología esférica con un diámetro típico de ca. 8.50 nm. Al igual que se hizo con los nanocubos, se demostró la posibilidad de variar las dimensiones de las partículas mediante la modificación de parámetros del proceso sintético como la concentración de precursores o la velocidad de calentamiento logrando, de este modo, la obtención de MNPs en el rango de tamaños de 5 a 15 nm que conservaban la morfología esférica y un elevado grado de monodispersidad. En este caso, se llevó a cabo un estudio completo de la inclusión de los elementos dopantes manganeso, cobalto y zinc en la estructura de las MNPs mediante la sustitución parcial del precursor férrico por los precursores de estos elementos metálicos en diferentes combinaciones y proporciones, ensayándose diferentes dopajes simples, dobles y triples. Se efectuó, asimismo, un análisis exhaustivo de los grados de incorporación de cada uno de los tres dopantes, y los consiguientes nanosistemas obtenidos fueron caracterizados estructuralmente mediante TEM, XRD, ICP-MS y FTIR. La caracterización magnética, por su parte, se llevó a cabo mediante medidas en un magnetómetro SQUID, determinando el comportamiento superparamagnético de las MNPs a temperatura ambiente y observando la influencia que los diferentes dopajes

ejercen sobre las características magnéticas de las mismas a baja temperatura. Como en el caso de las MNPs cúbicas, estas partículas esféricas fueron transferidas a medio acuoso mediante su recubrimiento con el complejo PMA-dodecilamina, tras el cual se evaluó su correcta funcionalización mediante medidas de velocimetría Doppler y su grado de agregación y estabilidad en varios fluidos biológicos de diferente complejidad a diversos tiempos de incubación de hasta 96 h mediante medidas de DLS.

En este Capítulo 3 también se sintetizaron MNPs con estructura núcleo-coraza, usando las ferritas de estructura homogénea antes descritas como semillas, y creciendo corazas magnéticas de diferentes características a su alrededor. En este caso, el estudio se centró en nanosistemas compuestos por núcleos de óxido de hierro dopados con cobalto y corazas de óxido de hierro dopadas con manganeso, sintetizando MNPs con diferentes dimensiones en ambas partes de su estructura dual. Este tipo de partículas fue transferido a medio acuoso y caracterizado estructuralmente de igual forma que las MNPs que sirvieron como semillas para su síntesis, esto es, las MNPs esféricas, focalizando en este caso el estudio en la influencia de los diferentes tamaños de los núcleos y corazas sobre sus propiedades magnéticas.

En el Capítulo 4 se describe la síntesis y caracterización de sistemas ordenados de MNPs de óxido de hierro en la forma de películas delgadas empleando la técnica de la litografía de copolímeros de bloque. Para ello, el precursor férrico empleado se hizo reaccionar con un copolímero de bloque de la familia de los poliestireno-*block*-poli-4-vinilpiridina (PS-*b*-P4VP) y, a continuación, la disolución resultante se empleó para la generación de películas delgadas sobre sustratos de silicio mediante la metodología de espín-coating. A continuación, se analizó la influencia sobre las características estructurales de los nanosistemas obtenidos de diferentes parámetros del proceso sintético como el disolvente empleado para la preparación de las disoluciones precursoras, la temperatura de reacción, la razón molar entre copolímero y precursor magnético, o el post-procesado al que fueron sometidas las películas delgadas. De este modo, se obtuvieron nanosistemas magnéticos con diferentes densidades superficiales de MNPs, poseyendo desde disposiciones cuasi-ordenadas de MNPs de baja densidad hasta muestras en las que las entidades magnéticas presentan un interespaciado prácticamente nulo conformando una especie de capa o tamiz poroso que recubría la práctica totalidad de los sustratos. De cara a la obtención de películas delgadas con una cantidad de material magnético lo suficientemente elevada para medir las características

estructurales de las mismas se prepararon algunas muestras mediante deposiciones sucesivas por espín-coating. La caracterización de estas películas delgadas magnéticas fue llevada a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), XRD, dispersión de rayos X (EDX), reflectometría de rayos X (XRR) y VSM.

En el Capítulo 5 se estudiaron varias de las potenciales aplicaciones de algunos de los nanosistemas magnéticos obtenidos en capítulos previos. Primero, se evaluaron las capacidades de generación de calor localizado (hipertermia) de las MNPs con morfologías cúbica y esférica obtenidas en los Capítulos 2 y 3, respectivamente, a través de la determinación de sus tasas de adsorción específicas (SAR). Este análisis se centró en determinar la influencia de los diferentes dopajes presentes en las respectivas MNPs sobre su capacidad de generación de calor al ser sometidas a un campo magnético externo. Asimismo, también se relacionaron los valores de SAR con las magnitudes características de los ciclos de histéresis medidos para cada nanosistema. Los campos alternos aplicados cumplieron, en todos los casos, los valores de amplitud y frecuencia establecidos como máximos de cara a la potencial traslación de los ensayos a la práctica clínica. En segundo lugar, se evaluó la capacidad de los diferentes tipos de MNPs sintetizadas como potenciales agentes de contraste negativos en imagen por resonancia magnética (MRI) a través de la determinación de sus coeficientes de relajación transversales (r_2). Al igual que en el caso de los valores de SAR, se relacionaron los valores de los coeficientes r_2 con los dopajes de cada uno de los nanosistemas, así como con los valores de magnetización de saturación y campo coercitivo característicos de los ciclos de histéresis de sus curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado. También se evaluó, de forma preliminar, la potencial aplicación de las MNPs con estructura núcleo-coraza sintetizadas en la segunda parte del Capítulo 3 como potenciales agentes de contraste para MRI y magnetotérmicos.

Tras la determinación de los SAR de las MNPs de forma cúbica y esférica, se escogieron aquellos nanosistemas que mostraron una mayor capacidad hipertérmica para su ensayo en modelos celulares *in vitro*. Se evaluaron, en primer lugar, las concentraciones críticas tóxicas de las distintas MNPs en varias líneas celulares como HeLa (cáncer cérvico-uterino humano), MDA-MB-231 (cáncer de mama humano) y RAW 264.7 (macrófagos murinos) a distintos tiempos de incubación (6 y 24 h), y

tomando el criterio estándar de considerar una cierta concentración de un compuesto como tóxica si el porcentaje de viabilidad celular tras su incubación es inferior al 80%. Tras determinar la citotoxicidad celular, se evaluó a continuación el grado de internalización de las MNPs en las células mediante microscopía óptica y confocal tras diferentes tiempos de incubación. Finalmente, se midieron los ciclos de histéresis y los SAR de varios de los nanosistemas magnéticos tras su internalización en las entidades biológicas.

Por último, se estudió el potencial empleo de los sistemas de MNPs esféricas de aproximadamente 8.50 nm diámetro sintetizados en el Capítulo 3 como potenciales agentes de depuración de disoluciones acuosas contaminadas con diferentes metales pesados. Para ello, se prepararon disoluciones de compuestos basados en mercurio y arsénico de diferentes concentraciones que fueron incubadas con los nanosistemas magnéticos durante 24 h, período tras el cual las MNPs fueron precipitadas. El análisis composicional del sobrenadante mediante la técnica de ICP-MS permitió determinar las cantidades de contaminantes adsorbidas sobre la superficie de las MNPs. Se ensayaron un total de cuatro sistemas diferentes de MNPs con distintos grados de dopaje, analizando la influencia sobre la capacidad de biorremediación de la tipología de las MNPs empleadas y del pH de los medios acuosos contaminados. Se modelizaron los datos de adsorción superficial medidos en los diferentes sistemas de MNPs, a cada uno de los pH estudiados y con los dos agentes contaminantes analizados, observando que si se ajustaban de manera satisfactoria al modelo de adsorción de Langmuir. Finalmente, se estudiaron las evoluciones temporales de los procesos de adsorción (cinéticas) bajo distintas condiciones de pH y concentración de las disoluciones de contaminantes, analizando el grado de ajuste de las curvas obtenidas a algunos de los modelos cinéticos de adsorción establecidos.

En el Capítulo 6, por último, se exponen las principales conclusiones que se obtuvieron durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Summary

Nanotechnology is defined as the discipline devoted to the design, production and characterization at the sub-micrometric scale of organic and inorganic materials, structures, devices and systems, and which allows a precise control over their shape, size and physical-chemical properties. Richard Feynman, Nobel Prize in Physics in 1965, was the first scientist to refer to the possibilities of manipulating matter at the nanoscale at his famous conference "There is Plenty of Room at the Bottom" in Caltech (Technological Institute of California) in December 1959. Since then, and especially during the last three decades, the study of systems with such low dimensions has led to a new field of research known as nanoscience, which includes nanotechnology. In this, different traditional areas of knowledge are interconnected such as, for example, physics, chemistry, biology, optics or electronics, and it has given rise to a great step ahead especially in the materials science area by allowing to control and manipulate matter and its properties in such reduced dimensions. The outstanding experienced advances have been possible thanks to the increasingly sophisticated technical available instrumentation and facilities and to the expectations created by this kind of nanosystems with unique properties and wide spectrum of potential technological applications.

The properties of these new nanoscale materials are, in most cases, completely different from those of their macroscopic bulk counterparts, reason by which the analysis of their characteristics and properties requires a profound review of the basic concepts associated with several disciplines such as solid state physics, optics or magnetism. On the other hand, the potential applications of this type of materials are as wide as the number of disciplines involved in their study and analysis as, for example, (bio)diagnostics, development of new therapies for disease treatments, or the manufacture of nano(opto)electronic devices. In addition, nanostructured materials are also characterized by having a significant percentage of their constituent atoms located at their free surfaces (that is, they possess a high surface-to-volume ratio), which makes them to hold a high reaction potential. Due to this characteristic, they also have potential interest in related applications exploiting such properties as in the case, for example, pollutant removal and nanocatalysis.

Among the different nanomaterials synthesized so far, those based on magnetic nanoparticles (MNPs) are one of the most interesting. This is due, fundamentally, to the possibility of inducing a magnetic moment in these nanoscopic particles, and their easy ordering by means of the simple application of an external magnetic field. These characteristics make this type of nanoparticles promising candidates to be used in different applications, which can range from electronics, engineering and optics to reach even more complex areas such as biomedicine, where MNPs are used for diagnosis, drug controlled release, immobilization of bioactive agents, magnetic separation of biological entities and/or magnetothermia under the application of external alternating magnetic fields.

In particular, MNPs based on iron oxides (in their three main crystalline phases: magnetite, maghemite and hematite) are particularly suitable for several of the previously mentioned applications as a consequence of their low toxicity and high magnetic power, among other characteristics. The properties of MNPs depend strongly on their morphology, crystallinity, composition and surface coating, but the size is undoubtedly the most influential factor that defines their behavior, existing some critical dimensions below which this type of nanostructured systems enter the so-called superparamagnetic regime. In this regime, the behavior of the magnetization of MNPs when the applied magnetic field is modified involves a hysteresis cycle with a null area, which for practical purposes is translated into a very low tendency to form particle clusters/aggregates under the application of an external magnetic field, which is of great importance in many of their potential bio-applications. For these reasons, current researches in this field are focusing on the design and obtaining of MNPs with a high magnetic power without significant increases in particle dimensions. Among the most common strategies to achieve this goal is the modification of MNPs morphology, the growth of magnetic shells with different characteristics surrounding particles cores or the modification of particles composition by introducing other metallic elements into their crystalline structure (doping).

Among the different available physical and chemical synthetic techniques for the preparation and obtaining of MNPs, such as co-precipitation, hydrothermal synthesis or sol-gel methodologies, thermal decomposition is the one which provides the greatest control over the structural characteristics and physical properties of the obtained nanoparticles. Its most important drawbacks are the production of a small

amount of magnetic material in each synthetic batch and, fundamentally, the obtaining of MNPs that possess a very hydrophobic coating, which makes the magnetic nanosystems to be only stable in low polarity media, such as hexane, chloroform or toluene. Therefore, a subsequent surface modification process is required to transfer these MNPs to aqueous environments in order to allow their use, for example, in biomedical, detoxification and pollutant-removal applications.

The present PhD Thesis consists of a total of six Chapters. In Chapter 1, an introduction about different concepts related to magnetism is made, especially focused on the magnetism of materials with dimensions within the nanometric scale. In the following four chapters, the synthesis and properties of several nanostructured magnetic systems of different characteristics in terms of their sizes, morphologies, compositions and surface coatings is discussed in great detail. These nanosystems were characterized from a structural point of view and a deep analysis about the variation of their corresponding physical properties upon modifications of their structure and composition is performed. In addition, their colloidal stability under different physiologically-relevant mimicking conditions together with their behavior in model *in vitro* biological environments (cell cultures) were also tested in detail. Then, the potential applicability of the different obtained magnetic nanomaterials was analyzed, in particular as imaging contrast and magnetic hyperthermia agents and as adsorbents for the removal of heavy ions of mercury and arsenic in polluted aqueous environments. Finally, the main conclusions extracted from the developed work are finally exposed in the last Chapter.

In this manner, in Chapter 1 a brief explanation of the different forms of magnetism that can occur in matter was carried out, with special attention to the hysteresis phenomena, which can be observed upon changes in the magnetization when the applied magnetic field is modified in some kinds of materials. In addition, the phenomenon of superparamagnetism was studied in detail, analyzing its physical origin and the characteristics and properties of the materials within this magnetic regime. Next, a detailed explanation of several aspects regarding MNPs was carried out, starting with the different physical and chemical synthetic methods commonly used for particle production and their advantages and disadvantages related to obtain simple, fast and economical magnetic nanosystems of the desired physico-chemical characteristics. It was exhaustively explained how the modification of different

structural characteristics of the MNPs affects their physical properties, especially focused on the role played by the particles crystallinity and morphology, the doping degree with different metallic elements such as nickel, cobalt, manganese or zinc, or the growth of magnetic shells around the particles. Several applications of MNPs were also reviewed, splitted into two large blocks: technological and biomedical applications. In the first block, the different characteristics and properties that MNPs should posses for their use in applications such as, for example, information storage on magnetic media, decontamination of heavy metal-polluted aqueous media, or the metal separation in industrial recycling were commented. Regarding biomedical applications, the different surface modification protocols that can be used to transfer MNPs to aqueous media were discussed, as well as those related to their use as heaters in magnetic hyperthermia treatments and as magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents were explained in detail. Some other uses of magnetic nanostructures in this field, such as drug transport and release, magnetofection, or multimodal imaging, amongst others, were also commented. In addition, in this Introduction Chapter the structure and properties of block copolymers were also described, focusing the explanation on their behavior when dissolved in selective solvents and on the origin of their nanostructuration in microdomains when prepared in the form of thin films. Next, it was detailed how the latter property can be exploited for the use of this type of polymers as templates for the synthesis of MNPs arrangements with nanoscopic order over micro-/macroscopic areas, as well as the main existing techniques for the preparation of those mentioned hybrid thin films and their respective advantages and disadvantages. Finally, in this first Chapter the main objectives of the present PhD Thesis are presented.

In Chapter 2, the synthesis of iron oxide MNPs with cubic morphology through the thermal decomposition technique is explained. By modifying different parameters of the synthetic process such as the precursor concentration, the time and temperature of reaction, the heating rate, or the metal precursors to stabilizing agent molar ratio, highly monodisperse cubic MNPs with sizes in the range of 25 to 100 nm were achieved as well as particles with other morphologies, such as octahedrons and cuboctahedrons. Besides, by means of the partial substitution of the ferric precursor by inorganic precursors of other metallic elements as manganese, cobalt or zinc, MNPs with different degrees of doping were also obtained. Next, an exhaustive

analysis of the structural characteristics of the different cubic MNPs obtained was performed through different experimental techniques such as transmission electron microscopy (TEM), high resolution transmission electron microscopy (HRTEM), selected area electron diffraction (SAED), X-ray diffraction (XRD), inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) or Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The different degrees of incorporation of the three doping metallic elements tested and their disposition within the different positions of the MNPs crystalline structure were also analyzed in detail. On the other hand, the magnetic characterization of the obtained nanoparticles was carried out by vibrational magnetometry measurements (VSM), focusing the analysis on the influence of temperature, MNPs sizes, and the doping degrees on the resulting magnetic properties and, particularly, on their hysteresis cycles at room temperature. Next, the transfer of some selected synthesized magnetic nanosystems to aqueous medium was assayed by two alternative procedures: a polymer coating process with poly(isobutylene- maleic anhydride) (PMA) with a 75% of their chains modified with dodecylamine, and a ligand exchange process using meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA). The correct functionalization of the magnetic nanosystems was evaluated by the determination of the MNPs electrical surface charge through the Doppler velocimetry technique. Finally, we analyzed the potential formation of clusters/aggregates of the surface-coated magnetic nanosystems after each coating process and their colloidal stability at different incubation times in several relevant biological media by means of dynamic light scattering (DLS) measurements.

In Chapter 3, iron oxide MNPs with spherical morphology and a typical diameter between 8-9 nm were synthesized again by means of the thermal decomposition technique. As done with magnetic nanocubes in the previous Chapter, the possibility of modifying the particles dimensions by altering several parameters of the synthetic process such as the precursor concentration and the heating rate was demonstrated. Spherical MNPs in the size range of 5 to 15 nm with a high degree of monodispersity were obtained. A complete study of the inclusion of the dopant elements manganese, cobalt and zinc in the spherical MNPs structure was carried out by means of the partial substitution in different combinations and proportions of the ferric precursor by those corresponding to these metallic elements, including different single, double and triple doping. An exhaustive analysis of the percentage of

incorporation of each of these dopants was carried out, and the resulting nanoparticles were structurally characterized by TEM, XRD, ICP-MS and FTIR. On the other hand, the magnetic characterization was carried out using a SQUID magnetometer. The superparamagnetic behavior of the obtained spherical MNPs at room temperature was confirmed, and how the different extents and types of doping influence the particle's magnetic properties at low temperature was elucidated. As in the case of cubic MNPs, these spherical particles were transferred to an aqueous medium by means of their coating with the PMA-dodecylamine polymeric complex, after which their correct functionalization was evaluated by Doppler velocimetry measurements. Finally, their aggregation state and colloidal stability in various biologically relevant-mimicking fluids were analyzed by means of DLS measurements at different incubation times of up to 96 h.

In this Chapter, MNPs with a core-shell dual structure were also synthesized using the previously synthesized spherical ferrites with homogeneous structure as seeds, and growing magnetic shells of different characteristics around them. In this case, this study was particularly focused on nanoparticles composed of iron oxide nuclei doped with cobalt and iron oxide shells doped with manganese, and which possess different sizes in both the core and the shell. This type of particles was transferred to an aqueous medium and structurally characterized as described above, with a special emphasis on analyzing the role the different core and shell dimensions played on the magnetic properties of this special type of MNPs.

In Chapter 4, we describe the synthesis and characterization of ordered arrangements of iron oxide MNPs in the form of hybrid thin films by means of the block copolymer lithography technique. A ferric precursor was reacted with a polystyrene-*block*-poly-4-vinylpyridine (PS-*b*-P4VP) block copolymer, and the resulting solution was used for the generation of the hybrid thin films on silicon substrates by spin-coating. Next, the influence of the different parameters of the synthetic process as the solvent used for the preparation of the precursor solutions, the reaction temperature, the copolymer to magnetic precursor molar ratio, or the films post-processing procedure, on the structural characteristics of the hybrid nanocomposites/films obtained was analyzed. In this way, nanosystems with different surface densities of MNPs were obtained ranging from quasi-ordered arrangements of low surface density MNPs to samples in which the magnetic entities are very close

together forming a kind of porous layer or sieve that covered almost the whole substrate. To obtain hybrid thin films with an amount of magnetic material high enough to measure their structural characteristics, some samples were prepared by successive spin-coating depositions. The characterization of these magnetic hybrid thin films was carried out by several techniques such as scanning electron microscopy (SEM) to evaluate the morphology of the hybrid films and the monodispersity of the nanoparticles on the silicon wafers; XRD and X-ray scattering (EDX) to determine the composition and the cristallinity of the obtained MNPs arrangements; atomic force microscopy (AFM) and X-ray reflectometry (XRR) to measure the thickness of the synthesized thin films; and VSM to obtain the magnetic response of the samples.

In Chapter 5, several potential applications of some selected magnetic nanoparticles obtained in previous Chapters were analyzed. Firstly, the capacity to generate localized heat (hyperthermia) of MNPs with cubic and spherical morphologies (obtained in Chapters 2 and 3, respectively) in the presence of an applied alternating magnetic field was evaluated through the determination of their specific adsorption rates (SAR) values. This analysis was particularly focused on determining the influences of the particle's sizes and morphologies and the different types and degrees of doping of the analyzed MNPs on the amount of heat produced. Likewise, SAR values were also related to the characteristic magnitudes of the hysteresis cycles measured for each selected nanoparticle. In all of experiments, the applied alternating magnetic fields were within the maximum allowed amplitude, frequency and amplitude-frequency product values for potential validation of the present results into the clinical practice. Secondly, the capacity of different types of synthesized MNPs as potential negative contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI) was evaluated through the determination of their transverse relaxation coefficients (r_2). As for SAR values, relationships between r_2 values and the doping degree of each selected nanoparticle and the saturation magnetization and coercitive field values, which characterized the hysteresis cycles of their magnetization vs. applied magnetic field plots, were established. The potential application of MNPs with core-shell structure, previously synthesized in the second part of Chapter 3, as potential contrast agents for MRI and magnetothermia was also preliminarily evaluated.

After the determination of SAR values of cubic and spherical MNPs, those particles showing the largest hyperthermic capacity were chosen for their evaluation in *in vitro* cell models. The toxic critical concentrations of the different MNPs in several cell lines as HeLa (human cervical cancer), MDA-MB-231 (human breast cancer) and RAW 264.7 (murine macrophages) were evaluated at different incubation times (6 and 24 h), taking the standard criterion of considering a particle concentration as toxic when the cell viability percentage was below 80% after the respective incubation period. After the determination of the cellular cytotoxicity, the internalization degree of the chosen MNPs inside cells was evaluated by means of optical and confocal microscopies after different incubation times. Finally, the magnetic hysteresis loops and SAR values of several magnetic nanostructures after their successful internalization inside HeLa cells were measured, and a comparison with the values previously obtained when freely dispersed in aqueous-based solutions was established.

Finally, the potential use of the spherical MNPs ca. 8.50 nm in size, previously synthesized in Chapter 3, as potential adsorption and magnetic separation agents of heavy metal ions in polluted aqueous environment was analyzed. To this end, solutions of mercury and arsenic-based compounds at different concentrations were prepared, and subsequently incubated with the MNPs for 24 h under mechanical stirring. Thereafter, the MNPs were precipitated using a static magnetic field. The compositional analysis of the supernatant, using the ICP-MS technique, allowed determining the amounts of metal pollutants adsorbed on the MNPs surfaces. A total of four different MNPs with different degrees of doping were tested, and the influence of the MNPs type and the pH of the polluted aqueous solution on the bioremediation capacity were elucidated. The obtained surface adsorption data measured for each different MNP system were modeled, being observed a Langmuir adsorption-type behavior. Finally, the temporal evolutions of the heavy metal ion adsorption processes at different pH and pollutant concentrations in solution were also studied, and the obtained data fitted according to some well-established models in order to get an insight into the adsorption kinetics.

To finish the present Thesis, in Chapter 6 the main conclusions derived from the work done are presented.

1. Introducción

1.1. Magnetismo en materiales

1.1.1. Tipos de magnetismo. Ciclos de histéresis

Los materiales se pueden clasificar según su comportamiento magnético en función de la respuesta que manifiestan ante la aplicación de un campo magnético externo. La orientación que toman los momentos magnéticos en el material permite identificar las diferentes formas de magnetismo existentes en la naturaleza (Figura 1.1) observándose hasta cinco tipos fundamentales: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo y ferrimagnetismo^{1,2}.

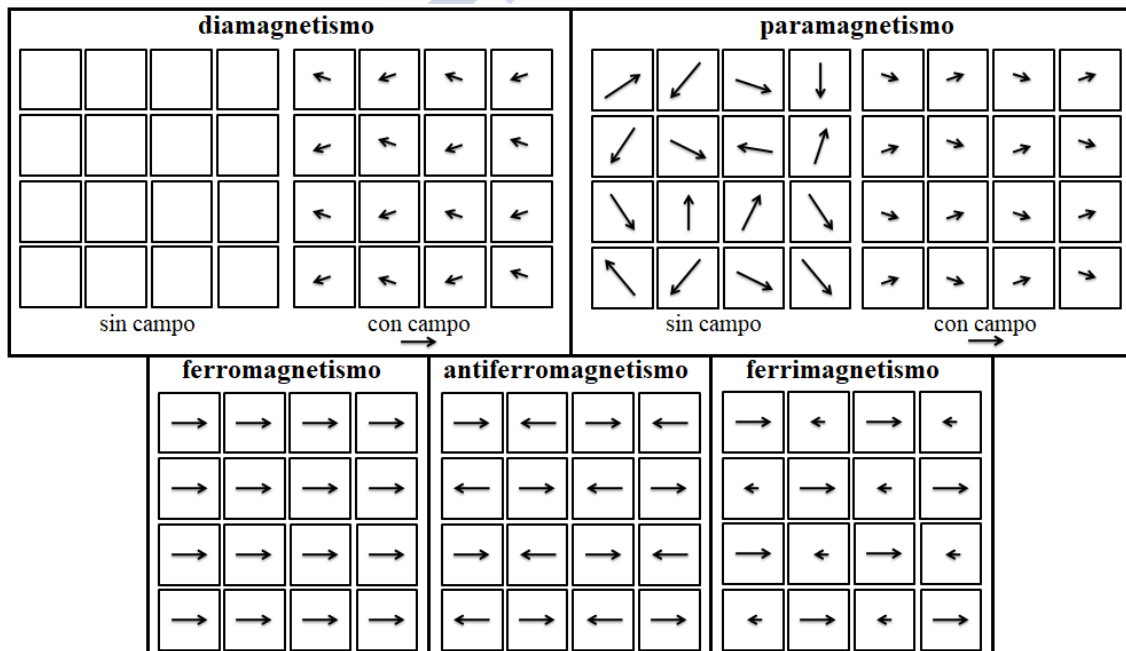


Figura 1.1: Orientación de los momentos magnéticos que dan lugar a las distintas formas de magnetismo/comportamiento magnético.

En presencia de un campo magnético externo, los electrones de los materiales magnéticos responden generando unas corrientes que intentan contrarrestar el efecto causado por dicho campo. Todos los materiales presentan, en mayor o menor medida, esta débil oposición al campo magnético externo aplicado, conocida como diamagnetismo³. En términos de configuración electrónica, el diamagnetismo es observado, principalmente, en materiales con subcapas electrónicas llenas donde los

momentos magnéticos están apareados y se cancelan entre sí. Los materiales diamagnéticos tienen una susceptibilidad negativa ($\chi < 0$) generalmente muy baja, de tal modo que se oponen de forma muy débil a los campos magnéticos.

Todos los demás tipos de comportamiento magnético observados en materiales tienen su origen en la existencia de electrones no apareados en las capas atómicas, típicamente en las capas 3d ó 4f. Los materiales cuyos momentos magnéticos están desacoplados son aquellos que decimos que presentan paramagnetismo. Por tanto, los momentos magnéticos en los materiales paramagnéticos no presentan un orden a largo alcance. El campo actúa de forma independiente sobre cada dipolo, alineándolos en su misma dirección y sentido, por lo que estos materiales presentarán una susceptibilidad magnética pequeña y positiva ($\chi \sim 0$)⁴.

Los materiales que presentan ferromagnetismo tienen momentos magnéticos atómicos alineados y de igual magnitud. Esto puede dar lugar a la existencia de una magnetización espontánea en ausencia de campo magnético. Los materiales que retienen permanentemente la magnetización en ausencia de campo magnético son conocidos en la literatura como imanes duros. Por su parte, hablamos de antiferromagnetismo cuando los materiales presentan momentos magnéticos atómicos de igual magnitud, pero su orientación varía 180° de átomo a átomo (son antiparalelos). Esta disposición da lugar a una magnetización neta nula⁵. Por encima de la llamada temperatura de Néel⁶, la energía térmica es suficiente para hacer que los momentos magnéticos de igual magnitud y sentido opuesto fluctúen de forma aleatoria, con lo que el orden de largo alcance desaparece. En estas condiciones el material exhibe un comportamiento paramagnético. El ferrimagnetismo es similar al antiferromagnetismo en el sentido de que los momentos magnéticos también presentan configuración antiparalela; sin embargo, en este caso, su magnitud no es igual, lo que conduce a la aparición de una magnetización neta que en el antiferromagnetismo no existe.

Por encima de una determinada temperatura (temperatura de Curie⁷ en los ferromagnéticos y ferrimagnéticos; y temperatura de Néel en los antiferromagnéticos) es posible superar las fuerzas de acoplamiento de los momentos magnéticos, y tanto los materiales ferromagnéticos, como los ferrimagnéticos y los antiferromagnéticos se comportan como materiales paramagnéticos con los momentos magnéticos desalineados.

Los espines alineados en materiales ferromagnéticos, antiferromagnéticos y ferrimagnéticos se agrupan en regiones o *dominios* dentro del material. Weiss comprobó que la formación de estos dominios magnéticos implica una disminución de la energía interna del material en cuestión⁸. El balance entre la energía necesaria para que se formen las fronteras que delimitan un dominio y la energía necesaria para “conservarlas” es la que nos permite calcular el tamaño mínimo del mismo. El tamaño de los dominios magnéticos oscila típicamente entre 20 y 500 nm, y depende fuertemente de las propiedades intrínsecas de cada material⁹. El límite entre dos dominios vecinos se conoce habitualmente como pared de dominio¹⁰, y consiste fundamentalmente en una rotación en la dirección del momento magnético como se ve en la Figura 1.2.

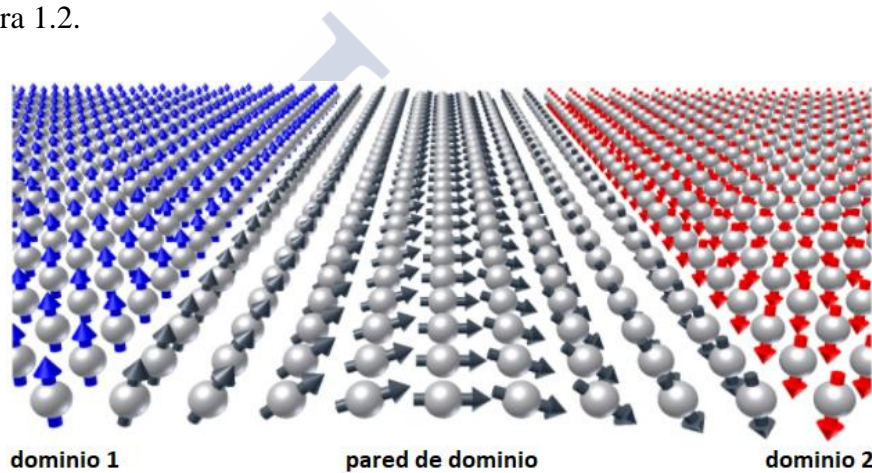


Figura 1.2: Representación esquemática de los momentos magnéticos en la frontera entre dos dominios. Adaptada de la ref. 10. Copyright (2010) con permiso de <https://www.psi.ch/media/research-at-swissfel-looking-into-magnetic-materials>.

Como se explicará en detalle en el Apartado 1.1.2, dependiendo de sus características dimensionales y estructurales, los sistemas magnéticos pueden presentar uno o varios dominios, según lo cual serán clasificados como sistemas mono- o multidominio.

En un material ferromagnético o ferrimagnético no magnetizado, el conjunto de espines paralelos en los dominios están orientados aleatoriamente a lo largo de todo el material, lo que da lugar a una magnetización neta nula. Al aplicar un campo magnético externo lo suficientemente intenso, los espines en cada dominio se orientan paralelamente a dicho campo hasta que todos los dipolos se alinean, alcanzando el valor

de magnetización máxima, llamado magnetización de saturación, M_S . Al disminuir el campo aplicado, la magnetización disminuye hasta el valor de magnetización remanente, M_R , magnetización que presenta un material a campo nulo tras haber estado expuesto a un campo magnético. Al variar la orientación del campo aplicado se elimina la magnetización del material. El campo necesario para retirar la magnetización que un material manifiesta después de haber estado sometido a un campo magnético externo se conoce como campo coercitivo, H_C ; y si se continúa aumentando el campo aplicado, el material presentará nuevamente una magnetización de saturación de valor contrario al indicado para el campo de sentido opuesto. Si se vuelve a disminuir y modificar el campo magnético aplicado, se alcanza el valor de magnetización remanente, de valor inverso al anterior, cerrando así el llamado ciclo de histéresis magnética¹¹ (Figura 1.3).

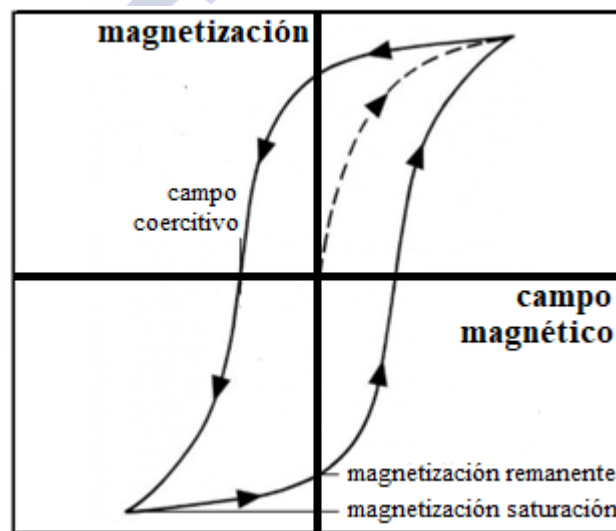


Figura 1.3: Forma típica de un ciclo de histéresis en un material ferro- o ferrimagnético.

Las curvas de histéresis magnéticas se producen en materiales que presentan ferromagnetismo o ferrimagnetismo, bien en materiales multidominio o bien cuando la temperatura es inferior a un cierto valor crítico denominado temperatura de bloqueo (magnitud que será definida en detalle en el Apartado 1.1.2) en materiales monodominio. Como consecuencia de estos ciclos de histéresis se generan pérdidas que pueden ser cuantificadas a partir del área de los mismos, y que se traducen comúnmente en una generación de calor¹². En los materiales multidominio cuanto mayor sea la resistencia a la movilidad que las paredes de dominio opongan, más anchos serán los ciclos de histéresis. Este comportamiento es el que manifiestan, por ejemplo, los imanes

permanentes, que poseen una elevada magnetización de saturación y grandes valores de magnetización remanente y de campo coercitivo. Por el contrario, si el desplazamiento de las paredes se produce de manera sencilla las curvas de histéresis serán más estrechas. Los imanes temporales presentan este tipo de curvas, poseyendo valores bajos de magnetización remanente y campo coercitivo, y perdiendo fácilmente la magnetización.

1.1.2. Superparamagnetismo

El término superparamagnetismo¹³ hace referencia a un fenómeno magnético que se observa en sistemas de partículas de tamaño muy reducido y que debe su nombre a que guarda ciertas semejanzas con el paramagnetismo.

La energía total de un sistema magnético está compuesta por varias contribuciones, que en primera aproximación podemos tratar como aditivas:

$$E = E_H + E_K + E_D + E_e + E_0 \quad (1.1)$$

Los cuatro primeros términos de la expresión anterior representan la energía de interacción con un campo magnético aplicado (energía Zeeman), E_H , la energía de anisotropía cristalina, E_K , la energía magnetostática, E_D , y la energía de intercambio magnético, E_e , respectivamente. E_0 engloba cualquier otra contribución a la energía libre. Para el caso en que no exista campo magnético aplicado, y considerando un monocristal con el eje de fácil imantación orientado en la dirección del cristal, tanto E_H como E_e presentarán su valor mínimo. Además, la energía magnetostática es inversamente proporcional al volumen de la partícula, de forma que en sistemas de tamaño muy reducido su valor se incrementa. Este aumento de energía magnetostática, debido al principio de conservación, se compensa con la reducción de la energía de intercambio magnético, que es la energía responsable de mantener las paredes entre los diferentes dominios dentro de las partículas. De esta forma, existe un tamaño crítico por debajo del cual la energía de intercambio no es lo suficientemente elevada como para mantener las paredes de dominio, adoptando así las nanopartículas magnéticas (MNPs) una configuración de dominio único o monodominio (Figura 1.4).

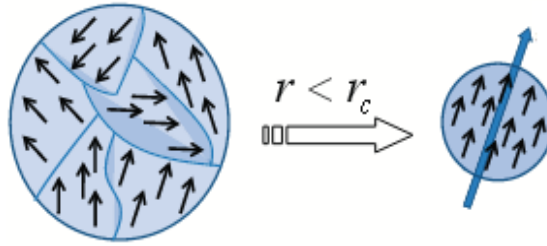


Figura 1.4: Representación de la transición de un sistema multidominio a un sistema monodominio al reducirse el tamaño del mismo por debajo de un valor crítico. Reproducida de la ref. 13. Copyright (2012) con permiso de *Bentham Open*.

Los valores de los tamaños críticos por debajo de los cuales los sistemas magnéticos entran en régimen de monodominio dependen fundamentalmente de su morfología y composición, aunque también juegan un papel importante otros factores como la pureza o la cristalinidad de las partículas. El diámetro crítico de un determinado material magnético se puede obtener mediante la siguiente expresión¹⁴:

$$D_c = \frac{36\sqrt{AK}}{\mu_0 M_s^2} \quad (1.2)$$

siendo A la llamada constante de intercambio, K la constante de anisotropía uniaxial, M_s la magnetización de saturación del material y μ_0 la permeabilidad magnética del vacío. En general, los valores del tamaño crítico se sitúan en el orden de unas cuantas decenas de nanómetros. En la Tabla 1.1 se exponen, a modo de ejemplo, los valores típicos de los parámetros para la obtención de los tamaños críticos para MNPs esféricas de hierro, cobalto y níquel en función de la expresión anterior; en la Figura 1.5 se muestran de forma esquemática los de diferentes sistemas más complejos.

Tabla 1.1: Tamaños críticos para obtener partículas monodominio de hierro, cobalto y níquel, y magnitudes que intervienen en el cálculo de los mismos según la ecuación (1.2).

	A [$\text{pJ}\cdot\text{m}^{-1}$]	K [$\text{MJ}\cdot\text{m}^{-3}$]	$\mu_0\cdot M_s$ [T]	D_c [nm]
Fe	8.30	0.05	2.15	6
Co	10.30	0.53	1.76	34
Ni	3.40	$-5\cdot 10^{-3}$	0.61	16

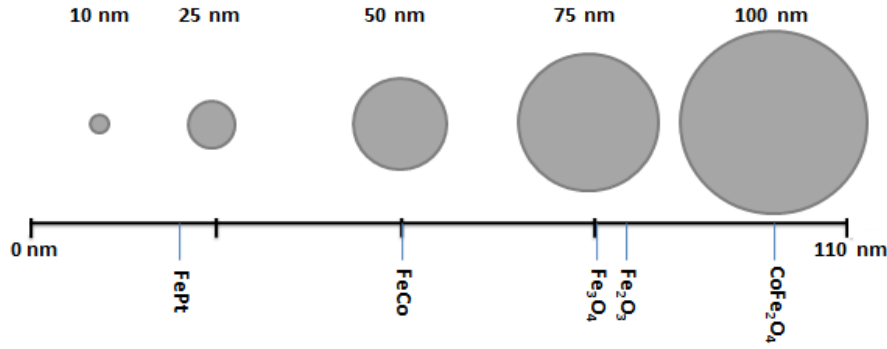


Figura 1.5: Valores de tamaño crítico de la transición a régimen monodominio determinados teóricamente en sistemas de MNPs esféricas de diferentes composiciones.

Las partículas monodominio pueden ser caracterizadas por un “supermomento”, μ_p , proporcional a la magnetización de la partícula. En primera aproximación y considerando una magnetización uniforme, este “supermomento” puede ser obtenido como el producto de la magnetización de saturación por el volumen de la partícula:

$$\mu_p = M_s \cdot V \quad (1.3)$$

El origen de esta magnitud está en la anisotropía magnética de las MNPs, que tiende a orientar los “supermomentos” según una cierta dirección privilegiada¹⁵. Para MNPs con anisotropía uniaxial y en las que todas las contribuciones a la misma se recogen en un término de anisotropía uniaxial efectiva, K , la energía asociada a la anisotropía de la partícula i puede ser descrita de la siguiente forma:

$$E_B = -K \cdot V_i \cdot \sin^2 \theta \quad (1.4)$$

siendo θ el ángulo que forman el “supermomento” magnético y el eje de anisotropía, y V_i el volumen de la partícula.

El momento de la partícula tendrá dos orientaciones preferentes e igualmente probables a lo largo del eje de anisotropía. Estas dos direcciones están separadas por una barrera de energía E_B de altura KV (Figura 1.6).

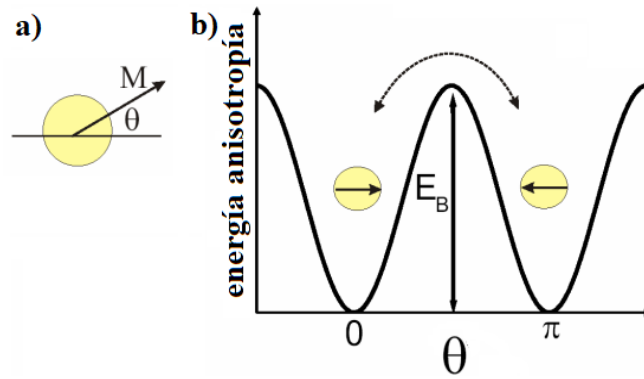


Figura 1.6: (a) Esquema de anisotropía magnética uniaxial y supermomento de una partícula; (b) energía de anisotropía en función del ángulo entre el supermomento y el eje de anisotropía. Reproducida de la ref. 13. Copyright (2012) con permiso de *Bentham Open*.

La influencia de la temperatura en este tipo de sistemas puede ser analizada de forma cualitativa en los límites de alta y baja temperatura. A muy alta temperatura, la energía térmica será mucho mayor que la barrera anisotrópica ($K_B T \gg E_B$) y, por tanto, la anisotropía magnética jugará un papel despreciable en la orientación de los momentos magnéticos de las partículas. En este caso, la dependencia de la magnetización con la temperatura será similar a la de los sistemas paramagnéticos y, entonces, se dice que las partículas tienen un comportamiento superparamagnético. Así, la principal diferencia entre el paramagnetismo y el superparamagnetismo es que, en el primero, el momento magnético está asociado a un único átomo, mientras que en el superparamagnetismo el momento está asociado a una partícula de dominio único, que contiene por lo general más de 10^5 átomos acoplados ferro- o ferrimagnéticamente (origen del término superparamagnetismo). La magnetización de una partícula superparamagnética está determinada por $M = N \cdot M_{at}$, siendo N el número de átomos magnéticos que conforman dicha partícula, y M_{at} la magnetización individual de cada uno de ellos. A muy bajas temperaturas, la energía térmica será irrelevante y los momentos se orientarán según el eje de anisotropía (mínimos de energía), estableciéndose las partículas en el denominado estado bloqueado. El valor de temperatura al que sucede la transición entre los dos regímenes comentados se denomina temperatura de bloqueo.

En función de esta temperatura de bloqueo, se puede calcular el tamaño de partícula al que tiene lugar el paso del estado bloqueado al estado superparamagnético. Como ya se ha comentado, la transición ocurre cuando la energía térmica y la energía de

anisotropía toman el mismo valor, por lo que desarrollando esta igualdad se puede obtener el valor del tamaño crítico superparamagnético:

$$K_B \cdot T_B = K \cdot V_C \rightarrow k_B \cdot T_B = K \cdot \frac{4}{3} \pi \left(\frac{D_C}{2}\right)^3 \rightarrow D_C = \sqrt[3]{\frac{6 K_B T_B}{\pi K}} \quad (1.5)$$

siendo K_B la constante de Boltzmann, K la constante de anisotropía de las MNPs, T_B la temperatura de bloqueo de las mismas y V_C y D_C los valores de volumen y diámetro críticos en el caso de MNPs esféricas. Este tamaño crítico de transición entre los regímenes bloqueado y superparamagnético es siempre inferior al tamaño crítico de transición entre los regímenes de monodominio y multidominio (Figura 1.7), si bien en algunos casos la diferencia entre ambos valores es muy reducida. En la Tabla 2.2 se muestran, a modo de ejemplo, los valores de los tamaños críticos de monodominio y del estado superparamagnético para MNPs de forma esférica de diferentes composiciones.

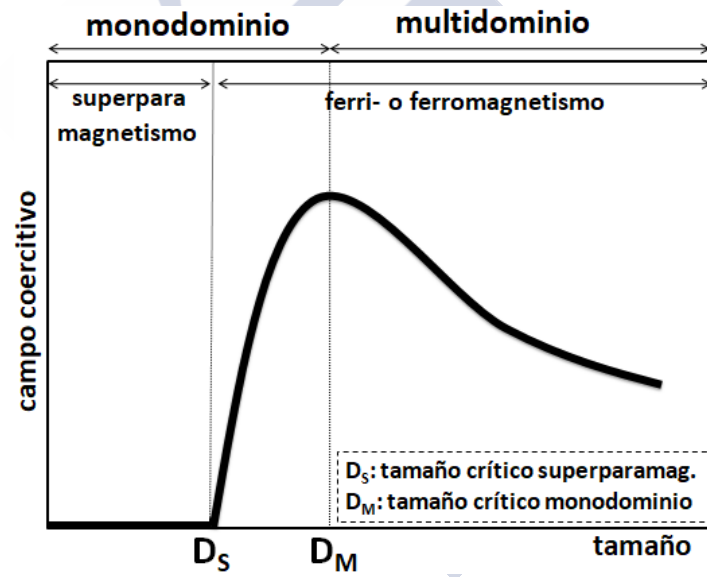


Figura 1.7: Curva típica de campo coercitivo frente a tamaño de NP indicando los diferentes regímenes y los tamaños críticos de las regiones de monodominio y superparamagnetismo.

Tabla 1.2: Tamaños críticos de monodominio (D_M) y del estado superparamagnético (D_S) de diferentes sistemas magnéticos.

	Co	Ni	Fe ₂ O ₃	Fe ₃ O ₄	FePt	FeCo	CoFe ₂ O ₄
D_S [nm]	5	15	16	15	1.5	10	5
D_M [nm]	34	16	79	75	19	50	98

Para estudiar como modulan la energía térmica los momentos magnéticos, Néel¹⁶ introdujo una magnitud llamada tiempo de relajación, que cuantifica el tiempo que una partícula tarda en saltar la barrera de anisotropía, es decir, en revertir la orientación de su momento magnético:

$$\tau_N = \tau_0 \cdot e^{\frac{E_B}{K_B T}} \quad (1.6)$$

dónde τ_0 depende de diferentes factores y tiene típicamente un valor comprendido entre 10^{-11} y 10^{-9} s, E_B es la altura de la barrera de energía de anisotropía, K_B la constante de Boltzmann y T la temperatura.

En estos sistemas, el comportamiento magnético depende del valor del tiempo típico de medición de la técnica experimental usada, τ_m , con respecto al tiempo de relajación τ propio del sistema asociado a la barrera de energía. Si $\tau_m \gg \tau_N$, la relajación ocurre más rápido que el promedio temporal de la orientación de la magnetización observado en esta ventana temporal, dejando que el sistema llegue al equilibrio termodinámico; así, lo que se observa es que el conjunto de partículas se comporta de forma análoga a un sistema paramagnético. Si por el contrario $\tau_N \gg \tau_m$, la relajación del sistema resulta muy lenta, y lo que se observa son propiedades cuasiestáticas como en los sistemas magnéticamente ordenados. Este régimen se denomina bloqueado, ya que se puede decir que el momento magnético estará “bloqueado” según el eje de anisotropía. La temperatura que separa estos dos regímenes es la temperatura de bloqueo T_B , que depende del tiempo característico de la medición τ_m . Esta temperatura de bloqueo, que se define como aquella en la que $\tau_m = \tau_N$, está asociada a la barrera de energía y, por ello, se incrementa con el aumento del tamaño de la partícula. Por el contrario, para un determinado tamaño de partícula, T_B disminuye con el incremento del tiempo característico de medición:

$$T_B = \frac{E_B}{K_B \cdot \ln(\tau/\tau_0)} \quad (1.7)$$

Por tanto, la temperatura de bloqueo depende de los parámetros intrínsecos de la partícula, pero también del establecimiento de un tiempo de medida acorde con el tiempo de relajación.

La temperatura de bloqueo puede ser determinada experimentalmente mediante la obtención de las curvas FC y ZFC (siglas en inglés de “field cooling” o enfriamiento con campo magnético aplicado, y “zero field cooling” o enfriamiento sin campo magnético aplicado, respectivamente), en las que se representa la magnetización de los sistemas frente a la temperatura en presencia y ausencia de campo magnético aplicado¹⁷. En este tipo de experimentos, inicialmente las muestras se enfrían hasta muy bajas temperaturas, por debajo de la temperatura de bloqueo (curva FC). Posteriormente, se aplica un pequeño campo magnético y el sistema se calienta hasta temperatura ambiente o superior. Finalmente, la muestra es enfriada de nuevo a muy baja temperatura manteniendo el campo magnético aplicado (curva ZFC). Según lo explicado en párrafos anteriores, por encima de la temperatura de bloqueo el comportamiento de las dos curvas será el mismo: la energía térmica tendrá más peso que la energía de anisotropía de forma que los momentos magnéticos fluctuarán libremente, y la magnetización neta de los sistemas tenderá a cero a medida que la temperatura aumenta. Por debajo de la temperatura de bloqueo, sin embargo, el comportamiento será diferente. Bajo un campo magnético aplicado, los momentos magnéticos se ordenarán según la dirección de este, dando lugar a una magnetización máxima (curva FC), mientras que en ausencia del campo no todos los momentos tomarán la misma orientación, de forma que la magnetización neta del sistema será menor (curva ZFC). De este modo, el valor de temperatura al que se produce la intersección de las curvas FC y ZFC se corresponderá con la temperatura de bloqueo del sistema estudiado (Figura 1.8).

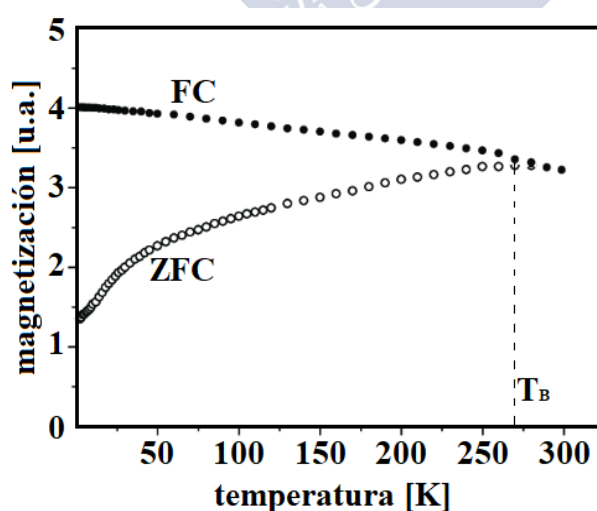


Figura 1.8: Perfil típico de las curvas FC y ZFC en MNPs superparamagnéticas, y determinación de la temperatura de bloqueo.

El superparamagnetismo es, por tanto, un efecto que sólo puede producirse en materiales de dimensiones por debajo del tamaño de monodominio y a una temperatura superior a la temperatura de bloqueo, de forma que en estos sistemas tanto el campo coercitivo como la magnetización remanente tienen un valor nulo¹⁸⁻¹⁹, es decir, no presentan ciclo de histéresis (Figura 1.9).

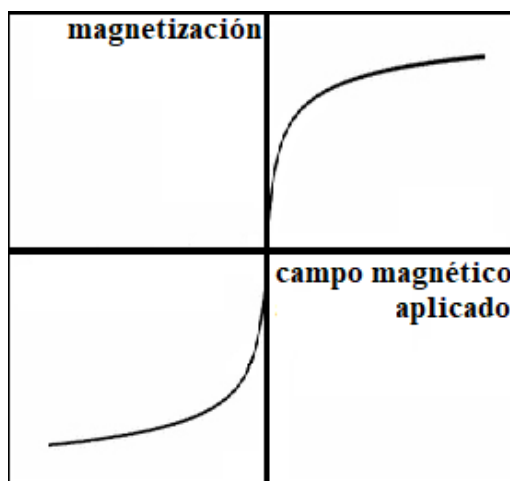


Figura 1.9: Curva típica de magnetización frente a campo magnético aplicado de un material monodominio en régimen superparamagnético.

1.2. Nanopartículas magnéticas (MNPs)

Las MNPs constituyen a día de hoy la base de los sistemas nanométricos más prometedores con un amplio abanico de potenciales aplicaciones, si bien es en el ámbito biomédico dónde se están llevando a cabo un mayor número de investigaciones al respecto^{20,21}. En concreto, las MNPs basadas en óxidos de hierro son de las más interesantes debido a sus excelentes propiedades en cuanto a su estabilidad en medios fisiológicos complejos, su baja biotoxicidad, y su elevada potencia magnética²². Las formas de óxido de hierro más estudiadas son principalmente tres: hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y magnetita (Fe_3O_4). La hematita es altamente estable frente a la corrosión dado que el hierro está completamente oxidado y compuesto únicamente de Fe^{3+} , es fácil de producir, altamente estable en agua, y suele ser utilizada en aplicaciones catalíticas o como parte de sensores de detección de gases²³. La magnetita se compone de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} dispuestos en una estructura cúbica de espinela inversa, de forma que la razón estequiométrica entre el hierro divalente y el trivalente es 1:2. El Fe^{2+} ocupa la mitad de las posiciones octaédricas y el Fe^{3+} se divide entre las

posiciones octaédricas restantes y la totalidad de las tetraédricas. La maghemita, por su parte, es la forma oxidada de la magnetita, y se compone enteramente de iones Fe^{3+} organizados en una estructura cúbica. Las propiedades de estas dos últimas formas de óxido de hierro son similares, resultando incluso complicada su diferenciación mediante las técnicas de caracterización estructural básicas, y ambos compuestos exhiben superparamagnetismo por debajo de un determinado tamaño crítico²³.

Las propiedades de las MNPs dependen fuertemente de su tamaño, morfología y composición, así como del recubrimiento de su superficie libre. De cara a su comportamiento magnético es especialmente importante el tamaño dado que, como ya se ha explicado anteriormente, existe un valor crítico de esta magnitud por debajo del cual las MNPs pasan al régimen de dominio único y exhiben superparamagnetismo. Así, las MNPs empleadas en el ámbito biomédico suelen ser superparamagnéticas debido, fundamentalmente, a que la ausencia de remanencia y coercitividad previenen la formación de agregados de partículas. Por ello, las investigaciones actuales se centran en la mejora de la potencia magnética de las MNPs sin tener que incrementar en exceso el tamaño de las mismas. Entre las estrategias más comunes para la consecución de este objetivo están la modificación de su morfología, el crecimiento de pequeñas corazas también magnéticas a su alrededor, o la inclusión en su estructura de diferentes iones magnéticos o no magnéticos (dopaje)²⁴.

1.2.1. Síntesis

Para el control preciso de las características y comportamiento de un material magnético, la selección del método de síntesis adecuado es de gran importancia. En las últimas décadas, el control sobre el tamaño, la forma y la composición de las MNPs ha sido ampliamente estudiado²⁵. Típicamente, los métodos de síntesis de MNPs se pueden dividir entre métodos físicos y métodos químicos. Los métodos físicos, tales como la evaporación térmica, la deposición por láser pulsado o la molienda suelen tener un alto rendimiento y proporcionan grandes cantidades de material, pero las propiedades de este suelen ser pobres²⁶. Además, estos métodos físicos suelen requerir el uso de equipamiento de laboratorio de alto coste. Por su parte, los métodos químicos dan lugar a más pequeñas cantidades de producto pero con mayor homogeneidad y mejor calidad. Entre los métodos químicos de síntesis de MNPs los más relevantes son los siguientes:

i) **Métodos sol-gel:** Las MNPs se producen por la condensación de los precursores tras su calentamiento. Esta técnica permite controlar el tamaño y la estructura de las MNPs generadas²⁷.

ii) **Co-precipitación:** Es el método más comúnmente utilizado para la preparación de MNPs para aplicaciones biomédicas. Esta metodología se basa en la co-precipitación de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en disolución acuosa. Mediante la variación de la razón entre ambas sales, el pH, la temperatura, el agente estabilizante, etc... se pueden controlar el tamaño final y el comportamiento magnético de las NPs sintetizadas. Entre las ventajas de este método se encuentran su bajo coste, la producción de sistemas directamente solubles en agua que luego pueden ser fácilmente modificados, y su escalabilidad. Entre los inconvenientes destacan su baja reproducibilidad y la producción de sistemas con una amplia distribución de tamaños que necesitan una posterior purificación²⁸.

iii) **Síntesis hidrotermal:** Este método se lleva a cabo en reactores o autoclaves bajo condiciones de alta presión y temperatura. Parámetros como la temperatura, el tiempo, los disolventes o la naturaleza de los precursores empleados y la razón entre los mismos influyen en la estructura, tamaño y formas de las MNPs sintetizadas. Como ventajas, este método también da lugar a MNPs solubles en agua con una mejor distribución de tamaños que las producidas por co-precipitación. El gran inconveniente es la necesidad de alcanzar muy altas temperaturas, con los altos costes en equipamiento que ello implica²⁹.

iv) **Descomposición térmica:** Este método consiste en la reducción de precursores metálicos bajo condiciones controladas a altas temperaturas (superiores a 200 °C), dando lugar a MNPs con un alto grado de homogeneidad, y permitiendo un gran control sobre su composición y su tamaño. Este método puede ser escalado para la producción de varios gramos de MNPs. Debido al alto control sobre la estructura cristalina y el tamaño, las propiedades magnéticas pueden ser fácilmente modificadas. El gran inconveniente de esta metodología es que se obtienen NPs no solubles en agua y, por tanto, es necesaria su transferencia a fase acuosa de cara a potenciales aplicaciones biológicas. Además, varios de los reactivos comúnmente empleados en esta metodología son tóxicos y, al igual que en los métodos hidrotermales, es necesario alcanzar temperaturas muy elevadas³⁰.

En resumen, todos los métodos mencionados presentan sus ventajas e inconvenientes. Sin embargo, cuando hablamos de materiales nanométricos el control preciso sobre el tamaño, forma y composición es sin duda el factor más importante, el cuál definirá el comportamiento y la respuesta final del sistema. Por tanto, aquellos métodos que produzcan sistemas de NPs homogéneos y que sean escalables serán los óptimos para la síntesis de MNPs. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el mejor método de síntesis entre los previamente mencionados es la descomposición térmica. En la Figura 1.10 se representan esquemáticamente las diferentes etapas de un ejemplo de síntesis de MNPs de óxido de hierro por descomposición térmica en la que se utilizó acetilacetonato de hierro ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) como precursor férrico, ácido oleico (OA) y oleilamina (OAm) como agentes estabilizantes y éter bencílico como medio líquido de alto punto de ebullición en el seno del que tuvo lugar la reacción³¹.

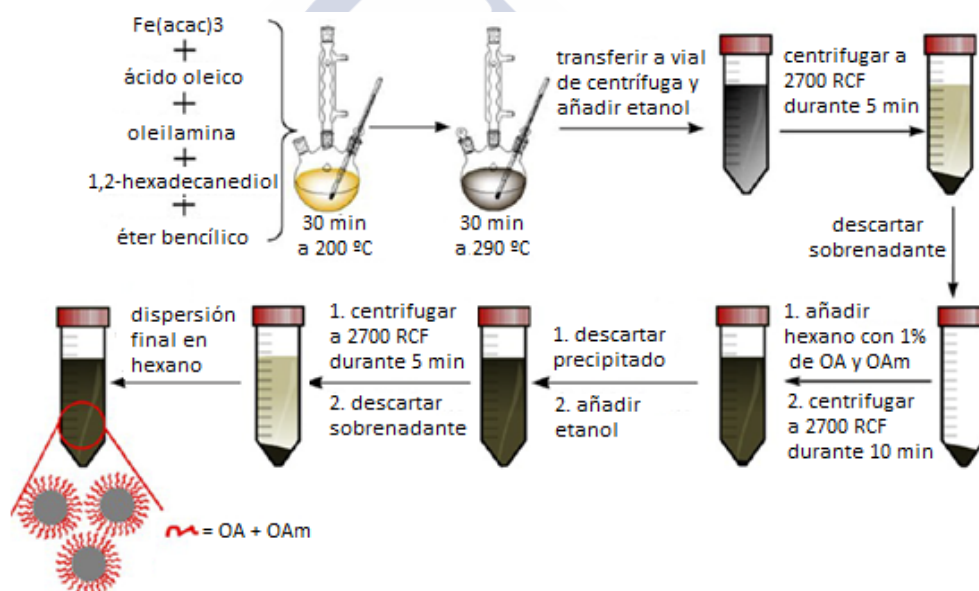


Figura 1.10: Esquema del proceso de descomposición térmica para la síntesis de MNPs de óxido de hierro. Adaptada de la ref. 31. Copyright (2017) con permiso de *American Chemical Society*.

1.2.2. Propiedades

Además de la influencia del tamaño y de la temperatura sobre las propiedades magnéticas de las MNPs, también son factores de capital importancia la morfología, cristalinidad y composición de las mismas. Debido a la elevada relación superficie-volumen de las MNPs, los momentos magnéticos localizados en su superficie tienen una

gran repercusión sobre la magnetización de estos sistemas. En la superficie de las MNPs existe un mayor desordenamiento de los momentos magnéticos, rompiéndose la simetría del cristal en esas regiones y originando cambios en la estructura de bandas, parámetros de red y/o coordinación atómica del cristal empeorando, así, las propiedades magnéticas²⁵. Al mejorar la cristalinidad de las MNPs se disminuye el espesor de la capa de momentos magnéticos desordenados que se produce en la superficie de estas (Figura 1.11), por lo que se incrementa su nivel de magnetización³².

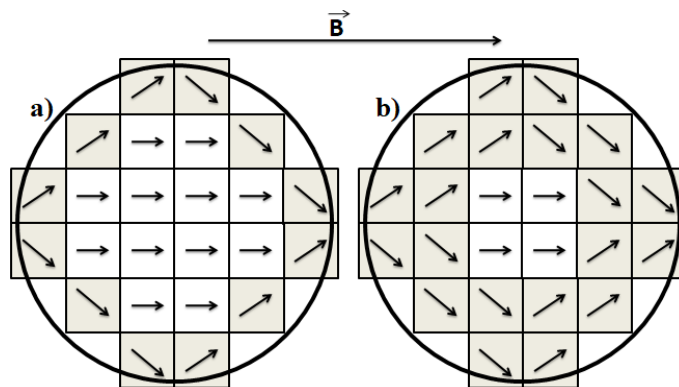


Figura 1.11: Representación esquemática del orden de los momentos magnéticos próximos a la superficie en MNPs esféricas de a) mayor y b) menor cristalinidad bajo la aplicación de un campo magnético externo.

Además de la cristalinidad, la morfología repercute significativamente en las propiedades eléctricas, ópticas y magnéticas de las MNPs, modificando las características que manifiestan según las distintas formas que presentan. Si la morfología no es esférica pueden encontrarse una o más direcciones de magnetización preferente, lo que se denomina anisotropía de forma, que influye en la coercitividad y saturación de las MNPs³³. Estas direcciones están relacionadas con la posición de los momentos magnéticos en la superficie de la NP y la anisotropía de superficie resultante. El desorden de los momentos magnéticos en la superficie se genera a partir de las vacantes existentes por la falta de átomos de oxígeno de coordinación alrededor del catión metálico. Cuando la superficie de coordinación de los cationes metálicos se asemeja a la simetría de coordinación del metal en el interior de la NP, la anisotropía se reduce. De esta forma, las MNPs de forma cúbica son particularmente interesantes ya que presentan una anisotropía de superficie mínima al mantener la simetría de coordinación de la estructura cristalina en la superficie (Figura 1.12), presentando un

menor número de vacantes aniónicas, que se traducirá en una mayor magnetización de saturación³⁴.

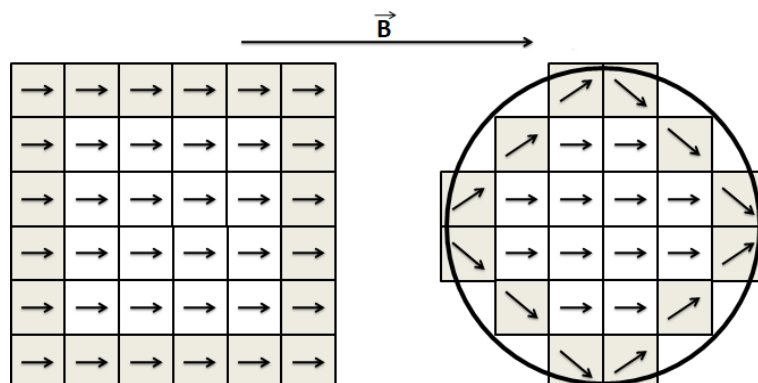


Figura 1.12: Representación esquemática de la ordenación de los momentos magnéticos próximos a la superficie en MNPs de forma cúbica y de forma esférica bajo la aplicación de un campo magnético externo.

Diferentes estudios han tratado de determinar experimentalmente la relación entre la morfología de las MNPs y las propiedades magnéticas que estas presentan. Así, por ejemplo, Guardia *et al.*³⁵ demostraron que la magnetización de saturación decrece progresivamente al pasar las MNPs de forma cúbica a forma de cilindro y forma esférica, respectivamente. En este caso, atribuyeron las variaciones a los diferentes volúmenes de las MNPs cuando estas tienen el mismo tamaño pero diferente forma. Es decir, considerando que las MNPs sean del mismo tamaño “d” (correspondiendo “d” al tamaño de arista en los nanocubos, al largo de los nanocilindros y al diámetro de las nanoesferas, respectivamente), el volumen de los nanocubos sería mayor que el de los nanocilindros, que a su vez sería mayor que el de las nanoesferas. De esta forma, se demostró que la variación en la morfología de las MNPs implica una variación en su volumen, con la consecuente modificación de la razón entre superficie y volumen y del porcentaje de momentos magnéticos desordenados, lo que conlleva diferentes valores en las magnetizaciones de saturación. Por su parte, Noh *et al.*³⁶ sintetizaron MNPs de óxido de hierro dopadas con zinc de formas cúbica y esférica manteniendo sus volúmenes constantes e iguales. Al igual que en estudios anteriores, las MNPs de forma cúbica presentaron una mayor magnetización de saturación que las de forma esférica, pero observándose que la variación de las propiedades magnéticas no es debida simplemente a pequeñas variaciones del volumen de las MNPs al modificar su forma

sino que la menor anisotropía de superficie de la morfología cúbica es un factor clave: el porcentaje de momentos magnéticos desordenados por efectos superficiales era de un 4% en las MNPs cúbicas y subía a un 10 % en las MNPs esféricas. Sin embargo, en otros trabajos como el de Montferrand *et al.*³⁷ se han sintetizado MNPs de magnetita cúbicas y esféricas de igual tamaño obteniéndose un comportamiento opuesto al descrito previamente, esto es, mostrando que las MNPs cúbicas poseen una menor magnetización de saturación que las esféricas. En este caso concreto, estos resultados inesperados están relacionados con el alto grado de polidispersidad y polimorfismo de las partículas obtenidas, especialmente las de simetría cúbica, como se deduce de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

Por otro lado, la composición de las MNPs también juega un papel clave en sus propiedades magnéticas. La estructura espinela de las ferritas de composición MFe_2O_4 (dónde M es un metal como hierro (magnetita), manganeso, cobalto, zinc...) puede describirse como una disposición de átomos de oxígeno con simetría cúbica con los cationes de M^{2+} y Fe^{3+} situados en posiciones cristalográficas que pueden ser de dos tipos según su coordinación con los átomos de oxígeno: tetraédricas y octaédricas³⁸. La celda unidad de la estructura tiene un total de 8 átomos en posiciones tetraédricas y 16 átomos en posiciones octaédricas (Figura 1.13). Cuando todas las posiciones tetraédricas están ocupadas por los cationes metálicos M^{2+} y las octaédricas por los cationes de hierro al sistema se le conoce como una estructura de espinela normal. Si, por el contrario, las posiciones tetraédricas están completamente ocupadas por iones Fe^{3+} y las posiciones octaédricas se reparten entre Fe^{3+} y M^{2+} a la estructura se le conoce como espinela inversa. En el caso de que ambos cationes estén presentes en los dos tipos de posiciones existentes hablamos de inversión parcial de la espinela. Los momentos magnéticos de los cationes situados en las posiciones tetraédricas se alinean de forma antiparalela a los situados en las octaédricas, dando lugar a un ordenamiento ferrimagnético. Según el catión metálico que sea incluido en la composición de las MNPs y su distribución en la estructura antes descrita, se podrán modificar de forma notable las propiedades de los sistemas magnéticos.

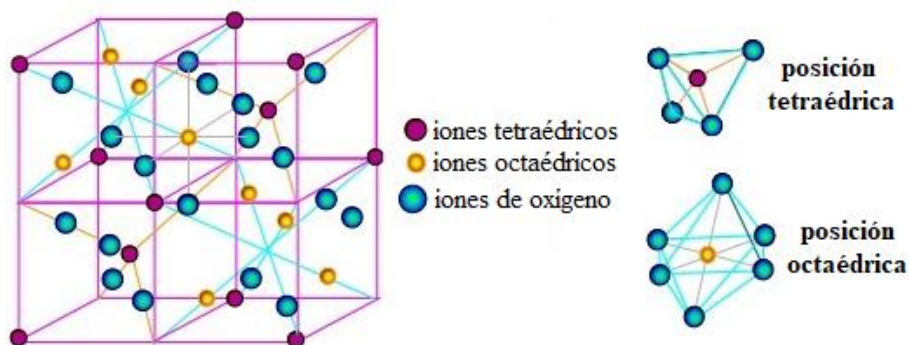


Figura 1.13: Estructura cristalina de espinela. Adaptada de la ref. 38. Copyright (2016) con permiso de <http://www.chemohollic.com/2016/07/spinels-normal-or-inverse.html>.

Así pues, a nivel esquemático, las composiciones de las MNPs con estructuras de espinela se pueden representar como:

- Espinela normal: $(M^{2+})^{tet} (Fe^{3+})_2^{oct} O_4$
- Espinela inversa: $(Fe^{3+})^{tet} (M^{2+}Fe^{3+})^{oct} O_4$

La distribución de los iones en la estructura de las MNPs determina su contribución al momento magnético total y, en consecuencia, su comportamiento bajo la influencia de un campo aplicado externo. En la estructura de espinela de la magnetita, los momentos magnéticos de los cationes situados en posiciones octaédricas se alinean paralelamente al campo aplicado, mientras que los situados en las posiciones tetraédricas lo hacen de forma antiparalela, tendiendo a disminuir el momento magnético neto²². De esta forma, el dopaje de las MNPs con diferentes cationes es una forma de modificar las propiedades magnéticas de las mismas sin variar su estructura cristalina dado que los iones de los elementos empleados se situarán en las posiciones tetraédricas y octaédricas de la red.

Así, por ejemplo, los cationes de cobalto y níquel se disponen en las posiciones octaédricas, dando lugar a estructuras espinelas inversas. También sucede con los cationes Fe^{2+} de hierro, dando lugar a la estructura de espinela inversa de la magnetita. Por el contrario, los cationes de zinc se sitúan en las posiciones tetraédricas originando espinelas normales. Un ejemplo de elemento dopante que se divide entre los dos tipos de posiciones originando espinelas parcialmente invertidas es el manganeso. De este modo, la estructura de las MNPs de magnetita es $(Fe^{3+})^{tet} (Fe^{2+}Fe^{3+})^{oct} O_4$, de forma que

el efecto de los momentos magnéticos de los cationes de Fe^{3+} en posiciones tetraédricas y octaédricas se cancelan, siendo la magnetización de saturación debida únicamente a los cationes Fe^{2+} situados en posiciones octaédricas³⁹. Por este motivo, los dopajes con elementos cuyos cationes se sitúan en posiciones octaédricas (cobalto, níquel...) no producen grandes variaciones en las magnetizaciones de saturación, dado que la cancelación del efecto de los momentos de los cationes Fe^{3+} se mantiene. Así, en estas MNPs dopadas, al igual que en las de magnetita, el momento neto total es debido exclusivamente a los cationes $2+$ situados en posiciones octaédricas (Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ...), cuyos momentos magnéticos no difieren en exceso, no produciendo muy importantes variaciones en las saturaciones. La introducción de estos elementos dopantes, en cambio, sí puede ser utilizada para variar otras características de las partículas magnéticas tales como su coercitividad. En cambio, los dopajes con elementos cuyos cationes se disponen en las posiciones tetraédricas de la espinela, tales como el zinc o, parcialmente, el manganeso, sí sirven para romper esta cancelación de los momentos magnéticos de los cationes Fe^{3+} , lo cual puede dar lugar, en función del elemento y del grado de dopaje empleados, a muy importantes variaciones en los momentos magnéticos totales de los sistemas y, por consiguiente, en las magnetizaciones de saturación^{40,41}.

Existen diversos trabajos los que se ha estudiado el efecto de introducir elementos dopantes en las MNPs de óxido de hierro a fin de modificar el comportamiento magnético de las mismas. Por ejemplo, Yelenich *et al.*⁴² estudiaron el efecto del dopaje de MNPs con manganeso (MnFe_2O_4), níquel (NiFe_2O_4) y cobalto (CoFe_2O_4), observando que la introducción de níquel y cobalto en la estructura de las partículas incrementaba la coercitividad de las mismas, mientras que la introducción de manganeso aumentaba tanto esta como la magnetización de saturación, si bien la variación de estas magnitudes no era excesiva con respecto a las medidas de las MNPs de magnetita pura sin dopaje alguno. El efecto del manganeso lo atribuyeron a su doble posicionamiento tanto en los sitios tetraédricos como octaédricos de la estructura de espinela. Un estudio similar fue el llevado a cabo por Larumbe *et al.*⁴³, quienes estudiaron el efecto de la inclusión de níquel en diferentes proporciones en la estructura de espinela de MNPs de óxido de hierro, no observándose variaciones significativas en las magnetizaciones de saturación de los sistemas resultantes. Gabal *et al.*⁴⁴, por su parte, examinaron el efecto de introducir diferentes cantidades de zinc en ferritas

dopadas con níquel comprobando que la magnetización de saturación aumentaba con la cantidad de zinc introducida. La explicación a este comportamiento la encontraron en la disposición de los cationes de zinc en las posiciones tetraédricas de la espinela sustituyendo a los cationes de Fe^{3+} , impidiendo así que los momentos magnéticos de estos se cancelasen con los de los situados en posiciones octaédricas, en consonancia con el comportamiento esperado y ya explicado en el párrafo anterior.

Otro parámetro que también juega un rol determinante en las propiedades magnéticas de las MNPs, además del tamaño, la morfología y la composición, es la anisotropía magnética, cuantificada a través de la constante de anisotropía K . Esta constante de anisotropía es una característica intrínseca de cada material magnético, y una forma de modificar su valor de forma relevante es mediante el crecimiento de una coraza alrededor de las MNPs (los núcleos), de tal forma que el acoplamiento entre las dos partes de estas estructuras duales y la energía de intercambio entre las mismas varíe la barrera de energía de anisotropía del sistema. De este modo, la formación de estas estructuras núcleo-coraza⁴⁵ se presenta como otra posible alternativa de cara a la modificación de las características magnéticas de las MNPs.

Típicamente, las MNPs núcleo-coraza sintetizadas presentan una parte de su estructura consistente en un material magnético blando (con baja constante de anisotropía, por ejemplo, óxido de manganeso) y una parte de un material magnético duro (con alta constante de anisotropía, por ejemplo, óxido de cobalto) de forma que en función de las composiciones y tamaños de ambas fases la constante de anisotropía del sistema dual tome un valor dentro de un rango óptimo. La manipulación de la constante de anisotropía mediante el crecimiento de estructuras con una parte blanda y otra dura implica, a nivel de respuesta ante un campo magnético, la combinación de los comportamientos a nivel individual de cada una de las partes de las MNPs. De esta forma, dependiendo de las proporciones de cada uno de los constituyentes de las estructuras núcleo-coraza, estas presentarán las elevadas magnetizaciones de saturación propias de los materiales blandos y los altos campos coercitivos propios de los materiales duros (Figura 1.14a), siempre y cuando núcleo y coraza estén correctamente acoplados. Dada la relación entre el tamaño de los ciclos de histéresis y la potencia disipada por las MNPs en forma de calor, esto permite ver de forma intuitiva el porqué de la elevada potencia magnética de este tipo de sistemas. Por ejemplo, Zhang *et al.*⁴⁶ sintetizaron MNPs de 15 nm de tamaño de óxido de cobalto y de óxido de manganeso

con composición homogénea, así como estructuras núcleo-coraza formadas por núcleos de óxido de cobalto y corazas de óxido de manganeso y viceversa. La potencia magnética de estas estructuras núcleo-coraza, cuantificada a través de la potencia de pérdida específica (SLP, siglas en inglés de “specific loss power”; concepto que será explicado en detalle en el Apartado 1.2.3.2) resultó mucho mayor que la de las partículas sin estructura dual debido a la modificación de la anisotropía de las mismas. Entre las estructuras núcleo-coraza, aquellas consistentes en núcleos de óxido de cobalto y corazas óxido de manganeso mostraron mejores propiedades magnéticas que las de estructura inversa. Estos mismos investigadores desarrollaron un modelo matemático en el que simulaban la potencia magnética de este tipo de nanosistemas en función de su tamaño, composición, etc... confirmando con el mismo sus resultados experimentales (Figura 1.14b).

Lee *et al.*⁴⁷, por su parte, desarrollaron un modelo teórico en el que calcularon la potencia magnética de las MNPs (cuantificada nuevamente mediante la SLP) en función de su magnetización, tamaño y constante de anisotropía, concluyendo que esta última jugaba un papel crucial, de tal manera que a valores de la misma comprendidos entre $0.5 \cdot 10^4$ y $4.0 \cdot 10^4$ J·m⁻³ las MNPs mostraban una mayor potencia magnética (Figura 1.14c). Estos mismos autores sintetizaron varios tipos de MNPs de aproximadamente 15 nm con estructura núcleo-coraza de diferentes composiciones, tales como óxido de cobalto-óxido de manganeso, óxido de manganeso-óxido de cobalto, óxido de cobalto-magnetita o magnetita-óxido de cobalto, y observaron que las partículas con una mayor potencia magnética fueron las compuestas por núcleos de óxido de cobalto modificadas con una pequeña cantidad de zinc, y corazas de óxidos de manganeso modificadas de igual forma ($\text{Zn}_{0.4}\text{Co}_{0.6}\text{Fe}_2\text{O}_4$ - $\text{Zn}_{0.4}\text{Mn}_{0.6}\text{Fe}_2\text{O}_4$). De esta forma, se volvió a confirmar que las MNPs con un material magnético duro en el núcleo y un material magnético blando en la coraza son las que ofrecen unos mejores resultados en términos magnéticos. Igualmente, Noh *et al.*³⁶ demostraron que la potencia magnética de MNPs de óxido de zinc, en este caso tanto de forma cúbica como de forma esférica, se incrementaba de forma notable al crecer sobre las mismas corazas de un material magnético duro como el óxido de cobalto.

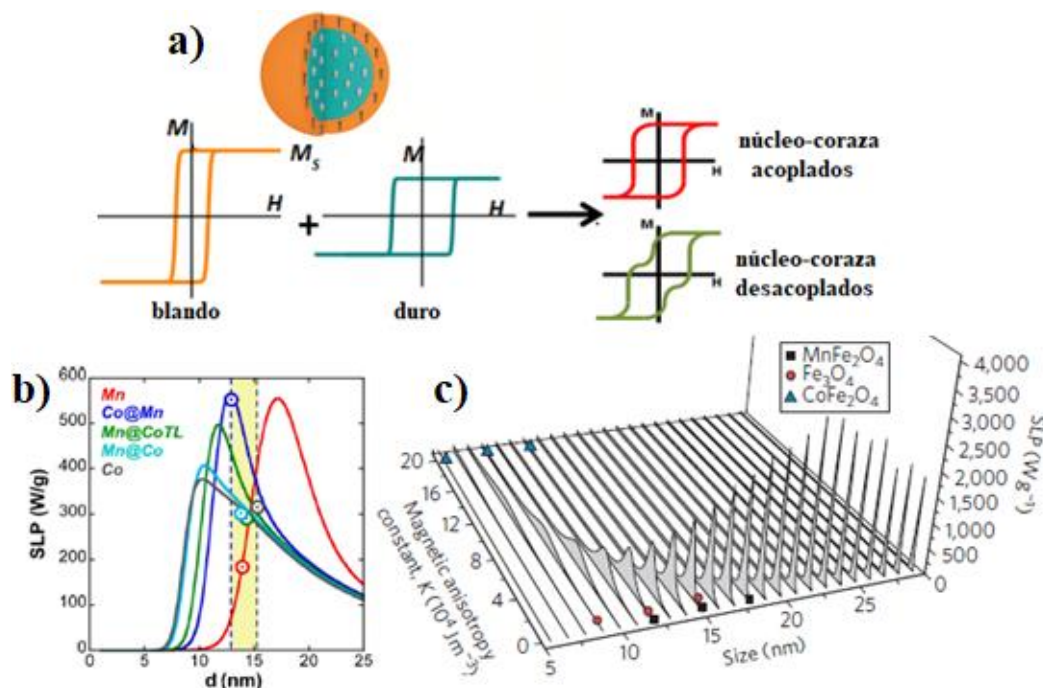


Figura 1.14: a) Representación de la combinación de los ciclos de histéresis de la parte blanda y dura de una estructura núcleo-coraza. b) Simulación de la potencia magnética de diferentes MNPs en función de su tamaño y composición. Reproducida de la referencia 46 Copyright (2015) con permiso de *American Chemical Society*. c) Simulación de la potencia magnética de MNPs simples y con estructura núcleo-coraza en función del tamaño y de la constante de anisotropía. Reproducida de la ref. 47. Copyright (2011) con permiso de *Nature Publishing Group*.

1.2.3. Aplicaciones

Los materiales magnéticos nanoestructurados poseen el potencial de ser empleados en una gran variedad de aplicaciones⁴⁸, que van desde los campos de la electrónica, la ingeniería y la óptica^{49,50} hasta alcanzar áreas más complejas como puede ser la biomedicina, dónde se emplean MNPs para el diagnóstico⁵¹, la liberación controlada de fármacos unidos a las partículas^{52,53}, inmovilización, separación magnética de entidades biológicas⁵⁴ y/o magnetotermia bajo la aplicación de campos magnéticos externos⁵⁵.

1.2.3.1. Aplicaciones tecnológicas

I. Almacenamiento de información

El almacenamiento de información en soporte magnético constituye, sin duda, uno de los pilares fundamentales del desarrollo tecnológico. La mayor parte de los módulos de lectura/escritura presentes en cualquier dispositivo electrónico están constituidos por una serie de elementos magnéticos en los que es posible inducir un momento magnético permanente en una determinada dirección⁴⁸. La orientación relativa de los momentos magnéticos de elementos sucesivos (paralelo/antiparalelo) permite definir un sistema de almacenamiento de información en código binario (0/1) (Figura 1.15). El aumento de la densidad de información almacenada en este tipo de memoria pasa, por lo tanto, por la reducción del tamaño físico de los elementos magnéticos que constituyen las unidades fundamentales de la memoria.

Las MNPs resultan, en principio, muy interesantes para esta aplicación, pero el comportamiento superparamagnético que adoptan al tener un tamaño tan pequeño es un problema que hay que resolver: La dificultad para mantener estables los momentos magnéticos limita seriamente el rango de su posible aplicación en este ámbito. Así, el uso de MNPs en medios de almacenamiento de información requiere aumentar la temperatura de bloqueo hasta temperatura ambiente para que así la información almacenada se mantenga en el tiempo. Recientemente, Skumryev *et al.*⁵⁶ demostraron que es posible aumentar la temperatura de bloqueo de MNPs de cobalto de 4 nm de diámetro recubriéndolas con una capa de óxido de cobalto de 1 nm de espesor. Estos autores consiguieron aumentar la temperatura de bloqueo desde 10 K hasta 320 K, abriendo la posibilidad de la utilización de este tipo de partículas en sistemas de grabación magnética. El espectacular aumento de la temperatura de bloqueo se basa en un efecto conocido como “exchange-bias”⁵⁷, que consiste básicamente en una contribución extra a la anisotropía debido al acoplamiento por intercambio entre los momentos magnéticos de la interfase núcleo-coraza que se encuentran en una configuración antiparalela.

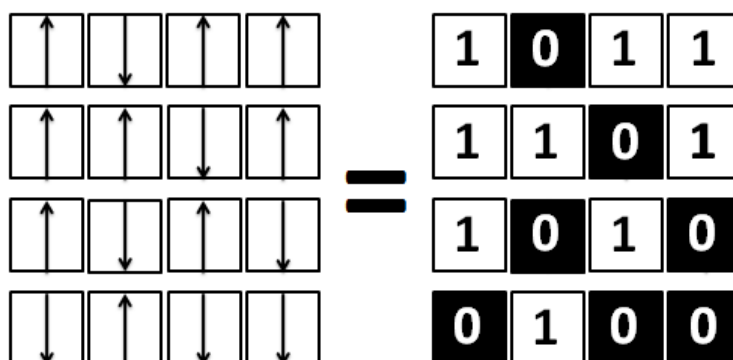


Figura 1.15: Representación esquemática de la conversión de un sistema de momentos magnéticos a código binario en un sistema de almacenamiento de información.

La introducción de componentes orgánicos que separen las NPs y eviten, de esta forma, un “comportamiento colectivo” es otra alternativa⁵⁸. El grosor y disposición de estas barrera orgánicas puede variar las propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas del sistema de MNPs, dando lugar a dispositivos como sensores magnéticos o membranas magnéticas de separación. En la escala nanométrica, las interacciones dipolo-dipolo no son despreciables frente a la energía de anisotropía de las MNPs, induciendo ciertas propiedades colectivas en el sistema. Estas interacciones son, a su vez, fuertemente dependientes de las distancias entre partículas, de ahí que interese obtener un grado de orden y homogeneidad lo más alto posible. Nótese que la magnitud de la interacción dipolar guarda una relación con la distancia de la forma $1/r^3$, de ahí que a muy bajas distancias como las de la escala nanométrica, una pequeña variación en la interdistancia entre partículas acarrea una gran variación en la energía de interacción. Por ello, los sistemas ordenados de MNPs de dominio único por debajo de su temperatura de bloqueo son los idóneos para aplicaciones de almacenamiento magnético de datos. La técnica de litografía de copolímeros de bloque^{59,60}, que se explicará en detalle en el Apartado 1.3, permite la obtención de patrones ordenados de MNPs de forma rápida. Este control preciso de la densidad, interdistancia y ordenamiento de las MNPs sobre un sustrato es de gran importancia para poder manejar sus propiedades a través de interacciones dipolares.

II. Tratamiento de agua contaminada

La contaminación de agua potable con diferentes metales pesados, tales como arsénico, mercurio, cromo, plomo o cadmio, supone una importante amenaza para millones de personas dada la alta toxicidad de estos compuestos. Varios estudios epidemiológicos mostraron que la exposición prolongada a agua potable contaminada con estos metales pesados puede dar lugar a serios problemas de salud como hiperqueratosis, enfermedades vasculares, diabetes, anemia y cáncer, así como también trastornos de los sistemas inmune, nervioso y reproductivo^{61,62,63,64}. En muchos lugares del mundo, el agua subterránea es la principal fuente de agua para consumo humano pero esta se encuentra habitualmente contaminada. Por tanto, la eliminación de metales pesados de esta agua subterránea antes de su paso a la red de suministro es fundamental desde un punto de vista sanitario.

De los metales pesados mencionados anteriormente, el arsénico es el que más comúnmente se encuentra en los yacimientos de agua contaminada. Se suele encontrar de dos maneras, como arsenito (As(III)) o como arsenato (As(V)), aunque generalmente ambas formas coexisten en diferente proporción dependiendo de las características del medio acuoso contaminado. Según varios estudios, el arsenito es más difícil de eliminar que el arsenato, ya que el primero se presenta, en muchas ocasiones, como una estructura H_3AsO_3 con baja afinidad por otros compuestos^{65,66}, lo que dificulta su eliminación mediante los métodos depurativos clásicos. Una pre-oxidación del arsenito sirve para dotar al mismo de una elevada carga iónica y, de esta forma, poder lograr una mayor eficiencia en su eliminación.

Son varios los métodos físico-químicos que se han estudiado para la purificación de agua como, por ejemplo, técnicas adsorción, coagulación, intercambio iónico o procesos de filtrado a través de membrana. De estos, la eliminación de contaminantes por adsorción (Figura 1.16) se presenta como la tecnología más estudiada y más prometedora para la eliminación de metales pesados debido a su simplicidad, bajo coste y alta eficiencia^{63,66}.

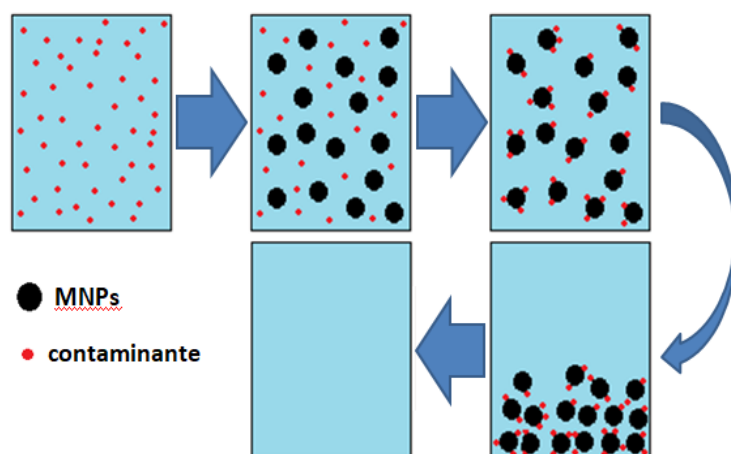


Figura 1.16: Representación esquemática de las diferentes etapas de un proceso de descontaminación de agua mediante adsorción usando MNPs.

De entre todas las estructuras estudiadas como adsorbentes, aquellas basadas en compuestos magnéticos resultan las más interesantes debido a su bajo coste, su baja toxicidad, su alta capacidad de adsorción y, por encima de todo, la facilidad de ser retiradas de las disoluciones acuosas mediante la simple aplicación de un campo magnético externo. Por otra parte, las estructuras nanométricas presentan otra importante ventaja como agentes adsorbentes como es su elevada razón entre su superficie y su volumen, lo que implica una elevada área de adsorción incluso empleando cantidades de material magnético muy reducidas^{63,67}. La combinación de esta última característica con la ya mencionada posibilidad de ser retiradas mediante la aplicación de un campo magnético hace de las MNPs unas candidatas ideales para ensayos de descontaminación de agua mediante adsorción de metales pesados⁶⁸.

Las MNPs más estudiadas como adsorbentes son las diferentes formas de óxido de hierro, especialmente magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)^{65,69,70}. Estas MNPs pueden ser utilizadas directamente como agentes para la adsorción de contaminantes⁷¹ o bien se puede modificar su superficie con compuestos orgánicos⁶⁹ o con algún tipo de cubierta porosa como la sílice⁷⁰, a fin de mejorar sus capacidades adsorbentes. Asimismo, son diversos los estudios en los que las estructuras magnéticas forman parte de complejos binarios con una parte que promueva la oxidación de los contaminantes y otra parte magnética que luego los adsorba más fácilmente. Por ejemplo, Zhang *et al.*⁷² estudiaron la eliminación de arsénico mediante una estructura binaria de óxidos de hierro y manganeso descubriendo que el óxido de manganeso favorecía la oxidación del

arsenito lo que, a su vez, facilita su posterior adsorción por parte del óxido de hierro. En otro trabajo reciente, Yu *et al.*⁶⁵ sintetizaron un complejo de maghemita y óxido de titanio en el que este último favorecía la oxidación catalítica del arsenito bajo radiación ultravioleta mejorándose su posterior adsorción por la maghemita. Sin embargo, todo el proceso que engloba la síntesis y aplicación de estos materiales binarios a fin de llevar a cabo esta etapa previa de pre-oxidación suele implicar unos tratamientos más complejos y, en consecuencia, más caros y, por lo general, las diferencias en los resultados entre el uso de estos complejos y el empleo de las estructuras magnéticas directamente como agentes adsorbentes no son especialmente significativas. Así, por ejemplo, muy recientemente Cheng *et al.*⁷³ estudiaron la adsorción de arsénico sobre MNPs superparamagnéticas de maghemita y hematita de aproximadamente 20 nm. En este estudio se observó que las isotermas de adsorción a diferentes pH obedecen la ecuación de Langmuir, con un grado máximo de adsorción a pH 7.0 de 46.5 mg de arsenito por gramo de MNPs. Por su parte, Balcells *et al.*⁷⁴ sintetizaron nanocuboides de magnetita de 5nm de tamaño que se emplearon también para la eliminación de arsénico en sus diferentes formas en medio acuoso, obteniendo un grado máximo de adsorción de 326 mg/g para el arsenito y 190 mg/g para el arsenato, respectivamente.

III. Otras aplicaciones tecnológicas

Aparte de las explicadas hasta el momento, existen otras aplicaciones tecnológicas de las MNPs que se están estudiando extensivamente en los últimos tiempos⁷⁵. Particularmente interesantes resultan los llamados ferrofluidos, consistentes en dispersiones de MNPs completamente estables en un medio líquido, típicamente agua o aceite. Para que un sistema sea considerado un ferrofluido la estabilidad debe ser muy elevada, de forma que las propiedades magnéticas del líquido sean completamente homogéneas y las MNPs no se agreguen ni precipiten incluso bajo la aplicación de fuertes campos magnéticos externos⁷⁶. Entre los usos más interesantes de estos ferrofluidos está, por ejemplo, su empleo en ejes de rotación de discos duros, evitando posibles daños estructurales y problemas de contaminación de los mismos. También se utilizan en bocinas y sistemas de sonido para prevenir el deterioro debido a la vibración, o como componentes de amortiguamiento en motores y suspensiones de vehículos, en los que ciertas piezas pueden quedar suspendidas en los ferrofluidos, sorteando de esta

forma el uso de soportes y disminuyendo los efectos de desgaste por contacto directo entre diferentes componentes^{77,78}.

Los ferrofluidos también pueden ser empleados en procesos de reciclaje para la separación de metales industriales⁷⁹. Para ello, los residuos metálicos industriales se depositan en grandes tanques llenos de ferrofluidos y, posteriormente, mediante la variación de la temperatura y la aplicación de diferentes campos magnéticos, se consigue extraer los diferentes metales de forma diferenciada, dado que estos emergerán en diferentes momentos en función de sus propiedades físico-químicas (Figura 1.17).

Por otra parte, uno de los campos más curiosos en los que se han estudiado las propiedades de las MNPs es el de la cultura y la paleontología. Las MNPs de magnetita que actuaban como pigmento en las pinturas rupestres en épocas ancestrales pueden proporcionar información precisa sobre la dirección del campo magnético terrestre y condiciones ambientales de aquel momento. Al secarse estas pinturas, los momentos magnéticos de los materiales empleados se “congelaron”, reteniendo información relevante referente al periodo histórico en el que fueron realizadas^{80,81}. Mencionar también, por último, los estudios que se están efectuando acerca del posible uso de MNPs en el campo de la seguridad bancaria, como parte de la estructura de módulos lectores y de tintas magnéticas⁸².

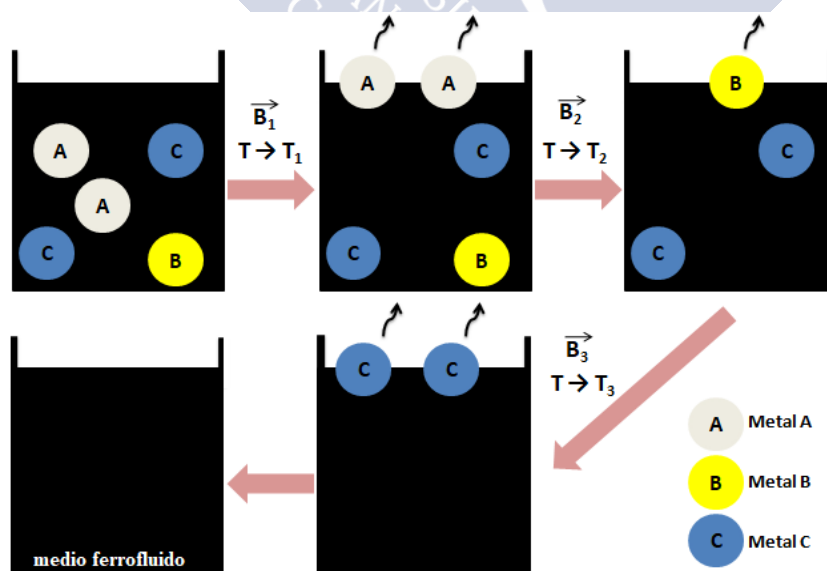


Figura 1.17: Representación esquemática de la separación selectiva de residuos metálicos industriales mediante su inmersión en un ferrofluido y aplicación de diferentes campos magnéticos y temperaturas.

1.2.3.2. Aplicaciones biomédicas

Hoy en día los principales tratamientos contra el cáncer se basan en quimioterapia, que puede ser combinada con radioterapia y/o cirugía para incrementar la eficacia terapéutica de cara a mejorar la supervivencia de los pacientes. El gran problema que presentan estos tratamientos es la dificultad de focalizar su efecto citotóxico exclusivamente en las zonas afectadas, así como el desarrollo de resistencias por parte de los tumores a los medicamentos, cada vez más común entre los pacientes sometidos a tratamientos prolongados. Estos inconvenientes indican claramente la necesidad de diseñar medicamentos/terapias más selectivos que se focalicen exclusivamente en las zonas tumorales. Algunos de los métodos más prometedores para desarrollar estos fármacos/terapias más eficaces se basan en el empleo de nanomateriales, fundamentalmente de NPs⁸³. Entre los distintos tipos, las NPs inorgánicas son particularmente interesantes debido a las singulares propiedades derivadas de su tamaño y composición. En la literatura se pueden encontrar numerosos ejemplos de cómo aprovechar estas propiedades para el desarrollo de nuevas terapias, agentes de contraste de imagen o biosensores más efectivos⁸⁴.

Desde la aparición de este interés por cómo los nanomateriales interactúan con la materia viva, las MNPs atrajeron una gran atención por parte de la comunidad científica. Esta atención está relacionada con sus propiedades fisicoquímicas únicas. Sus múltiples respuestas a campos magnéticos externos (alternos y no alternos) se han empleado para diferentes propósitos que incluyen terapia, diagnóstico y teragnóstica médica (diagnóstico y terapia en una única plataforma). Las MNPs ideales para aplicaciones biomédicas deben cumplir determinadas condiciones⁸⁵:

- i) Ser coloidalmente estables en medios biológicos (por ejemplo, en un medio acuoso con alta fuerza iónica, y alta concentración de proteínas y otras biomoléculas fundamentales).
- ii) Mantener sus características magnéticas constantes durante un largo tiempo en el medio antes descrito.
- iii) Evitar la fuga de iones tóxicos de las mismas.
- iv) Estar adecuadamente modificadas de forma que puedan ser focalizadas/dirigidas en/a las zonas de interés.

Los sistemas basados en MNPs ideales para aplicaciones biomédicas deben consistir, por tanto, en complejos híbridos compuestos por un dominio inorgánico y un recubrimiento orgánico.

Como ya se ha comentado anteriormente, las MNPs de mayor calidad se obtienen mediante la técnica de descomposición térmica, aunque estas presentan el inconveniente de que tras el proceso sintético sólo son estables en disolventes orgánicos. Por lo tanto, de cara a potenciales aplicaciones biomédicas se necesita modificar su superficie para dar lugar a MNPs solubles en agua. En cualquier caso, los tensioactivos usados típicamente en la síntesis que proporcionan directamente MNPs solubles en agua no dotan a las mismas de la mejor estabilidad coloidal y no permiten su conjugación adicional con moléculas de relevancia biológica como, por ejemplo, fármacos, anticuerpos, péptidos, carbohidratos, etc... por lo que también suele ser necesaria su modificación superficial adicional.

Uno de los procedimientos más utilizados para modificar la superficie de las MNPs y que estas pasen de ser estables en medio orgánico a ser estables en medio acuoso es la técnica de recubrimiento polimérico. Este método consiste en la formación de una micela de polímero alrededor de la MNP. La gran ventaja de esta técnica es su posible aplicación a NPs de cualquier material, forma y tamaño^{86,87} (Figura 1.18c). La única condición necesaria es que originalmente la superficie de la NP esté recubierta con cadenas alifáticas como, por ejemplo, las del ácido oleico o la oleilamina, que son los surfactantes habitualmente utilizados durante las síntesis por descomposición térmica. Una segunda gran ventaja de este método es que se pueden usar diferentes polímeros anfifílicos, proporcionando así MNPs con diferente carga superficial⁸⁸. Otra técnica con la que dotar a las MNPs de estabilidad en medio acuoso es la técnica de intercambio de ligando, que consiste en sustituir los ligandos originales de las MNPs por otros que interaccionen más fuertemente con su superficie³¹ (Figura 1.18b). Para obtener la estabilidad en medio acuoso de MNPs se usan típicamente ligandos que contengan numerosos grupos de coordinación como ácido dimercaptosuccínico^{89,90} o dopamina⁹¹.

Otra estrategia posible es la encapsulación de las MNPs en otras NPs de naturaleza orgánica. Este método puede llevarse a cabo si la síntesis de estas NPs orgánicas tiene lugar en un disolvente dónde las MNPs inorgánicas sean solubles⁹². Si

esto no es posible, alguna de las técnicas explicadas anteriormente se puede aplicar en primer lugar para dotar a las MNPs inorgánicas de estabilidad en medio acuoso y, luego, “atraparlas” en, por ejemplo, cápsulas poliméricas formadas por varias capas⁹³ (Figura 1.18d).

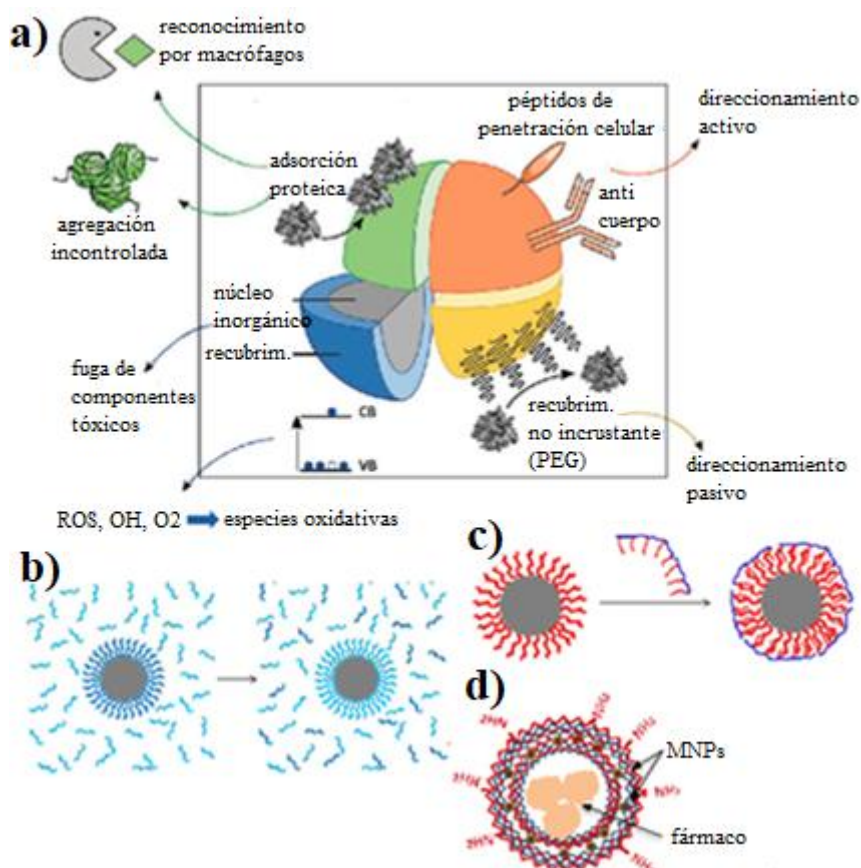


Figura 1.18: a) Representación de varios de los posibles escenarios para introducir MNPs inorgánicas en un medio biológico. Adaptada de la ref. 85. Copyright (2013) con permiso de *Wiley-Blackwell*. Representación esquemática de: b) el proceso de intercambio de ligando, c) el proceso de recubrimiento polimérico y d) cápsula polimérica con MNPs incrustadas en sus paredes. Reproducidas de la ref. 31. Copyright (2017) con permiso de *American Chemical Society*

La modificación superficial de las MNPs para conseguir su solubilidad en medio acuoso no garantiza su estabilidad al ser introducidas en medios biológicos complejos. Desde el inicio de la investigación sobre el uso de nanomateriales en el ámbito biomédico, diferentes investigadores observaron la existencia de comportamientos y

respuestas incontrolables/inesperadas cuando las partículas entran en contacto con células y organismos vivos. Esta es la razón principal que explica por qué las expectativas surgidas en un inicio alrededor del campo de la nanomedicina no hayan sido aún cumplidas^{94,95}. En el caso de las MNPs, la naturaleza y las características del recubrimiento de las mismas son, en muchas ocasiones, más importantes que el “núcleo” de la propia partícula a fin de prevenir la agregación cuando se aplica un campo magnético externo, factor clave para su potencial aplicación biomédica. Esta agregación, debida a sus momento magnéticos, es especialmente crítica en las MNPs ferro- o ferrimagnéticas, que presentan un momento magnético permanente. Esta es la razón por la que esta clase de MNPs no suelen ser utilizadas para fines médicos, especialmente aquellas de tamaño muy elevado que poseen una magnetización permanente importante y se agregan con suma facilidad bajo la aplicación de un campo magnético externo.

Una vez que las MNPs se introducen en un medio biológico complejo, las proteínas presentes en el mismo se adsorberán de forma no específica modificando sus propiedades superficiales. Si la estabilidad coloidal se mantiene, las características y propiedades del núcleo magnético del sistema se conservarán, aunque estas pueden ser ligeramente alteradas debido al cambio en el radio hidrodinámico tras la adsorción proteica⁸⁵ (Figura 1.18). Sin embargo, las consecuencias de esta unión de proteínas a las MNPs no se limitan a la estabilidad coloidal, ya que lo que las células van a “ver” también cambiará debido a la presencia de esta corona proteica. Recientemente, la importancia de la orientación de cada proteína en la superficie de las NPs y qué epítomos están expuestos al medio y, por tanto, a las entidades celulares está siendo ampliamente estudiada⁹⁶.

Una vez abordada la modificación superficial de los sistemas para lograr su correcta solubilidad en medio acuoso y los potenciales contratiempos que surgen al introducirlos en medios biológicos complejos, el siguiente gran problema a considerar es la métrica a utilizar en los experimentos de cara a poder comparar las dosis suministradas y los efectos que de ello se derivan. Así, la métrica empleada es crucial para poder normalizar correctamente las dosis administradas tanto *in vitro* como *in vivo* y, en consecuencia, para la correcta determinación del efecto de medicamentos, agentes génicos, anticuerpos y/o distintos nanomateriales^{97,98}, incluidos los sistemas basados en MNPs. Cuando se compara la interacción *in vitro* o *in vivo* de diferentes sistemas de

NPs, las características físicas de estas deben ser consideradas. Típicamente, las dosis se expresan en unidades de masa por unidades de volumen (por ejemplo: mg ml^{-1}). Esta no es una buena métrica cuando, por ejemplo, comparamos dos tipos de NPs con el mismo núcleo inorgánico pero con diferente recubrimiento orgánico. Este efecto es especialmente relevante al disminuir el tamaño de las NPs. Por ejemplo, en NPs de aproximadamente 5 nm, el porcentaje en peso proporcionado por el recubrimiento orgánico está en el mismo orden de magnitud que el núcleo inorgánico, lo que arroja diferencias en la concentración de NPs incluso de hasta un 50%⁹⁷. Para resolver este problema, una buena solución es determinar el peso molecular de las NPs y expresar la concentración en forma de molaridad o en número de NPs por unidad de volumen. Estas son buenas métricas para poder comprender sin equívocos el efecto de cada NP (Figura 1.19). Sin embargo, calcular de forma precisa el peso molecular de algunos tipos de NPs no siempre es posible, especialmente cuando nos salimos de las morfologías habituales como, por ejemplo, en las NPs ramificadas. El papel de la superficie es otro factor a considerar ya que los átomos localizados en esta son más reactivos. Por lo tanto, si las NPs no se estabilizan adecuadamente o son metabolizadas por células u organismos vivos⁹⁹, estos átomos reaccionarán más fuertemente con el entorno.

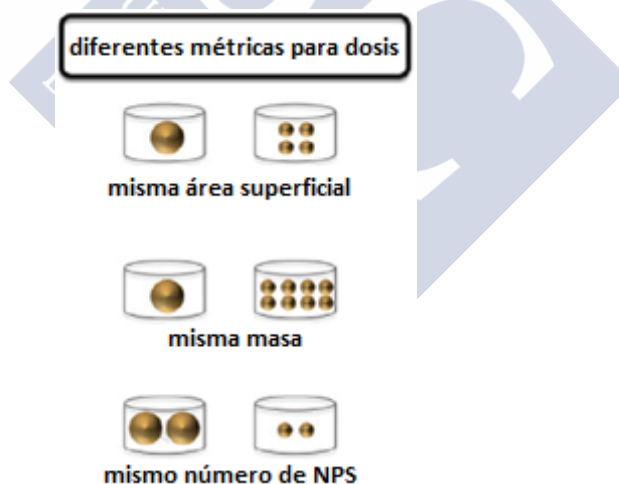


Figura 1.19: Representación gráfica de diferentes métricas para comparar las dosis empleadas. Adaptada de la ref. 98. Copyright (2016) con permiso de *Wiley-Blackwell*.

Tras ser tratados los problemas referentes a la modificación superficial y estabilidad coloidal de las MNPs, así como los relacionados con la métrica a utilizar para poder efectuar la correcta comparación entre diferentes ensayos, a continuación

abordaremos brevemente algunas de las diferentes aplicaciones biomédicas de este tipo de nanosistemas. Cabe destacar, en primer lugar, que el uso de ciertos tipos de óxidos de hierro en humanos ya está aprobado por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, siglas en inglés de “European Medicines Agency”) y por la Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA, siglas en inglés de “Food and Drug Administration”), pues se ha demostrado que las MNPs de óxidos de hierro son degradadas por la enzima hemoxygenasa-1 para formar hemoglobina¹⁰⁰, de forma que no permanecen en el organismo durante un largo periodo de tiempo. Así, por ejemplo, Kolosnjaj-Tabiet *et al.*¹⁰¹ llevaron a cabo un estudio de degradación de MNPs *in vivo* durante más de un año, demostrando que los sistemas magnéticos eran asimilados por el cuerpo. Estos autores prepararon estructuras núcleo-coraza con un núcleo de oro de 5 nm y una coraza de magnetita de 4 nm de espesor, funcionalizadas con dos recubrimientos poliméricos diferentes. Los resultados obtenidos mostraron que la coraza de hierro era la primera en degradarse, proceso tras el cual numerosas proteínas con hierro almacenado se localizaban en los alrededores de las NPs, lo cual sugiere que dichas proteínas juegan un rol principal en la degradación de la coraza. Los núcleos de oro se degradaron de forma mucho más lenta, llegando incluso a observarse gran parte de los mismos al finalizar el período de estudio. Además, la velocidad de degradación de los nanosistemas fue diferente según el polímero empleado para efectuar el recubrimiento, confirmando el papel clave de este parámetro. De igual manera, Mazuel *et al.*¹⁰² confirmaron la rápida degradación de MNPs de óxido de hierro en el interior de células madre durante un período de tiempo de un mes. Chiarelli *et al.*¹⁰³, por su parte, estudiaron la biodistribución de MNPs de óxido de hierro de 12 nm recubiertas con polietilenglicol (PEG) en modelos animales (macacos y ratones), concluyendo que los sistemas se distribuían de forma similar en sangre y músculos y en órganos como el hígado y el bazo, y de forma completamente diferente en otras partes como la médula, el cerebro o los riñones. Estos resultados muestran la importancia de los ensayos en modelos animales para comprender el verdadero comportamiento de los sistemas magnéticos al ser introducidos en organismo vivos, en muchos casos completamente diferente del que se podía esperar a partir de cálculos teóricos, simulaciones y ensayos *in vitro*.

I. Transporte y liberación de fármacos

Cuando se comenzó a estudiar la potencial aplicación de distintos tipos de nanomateriales para tratar diversas enfermedades, el objetivo principal fue la creación de transportadores de fármacos ideales que se dirigiesen específicamente a la región de interés (ROI, siglas en inglés de “region of interest”) a fin de reducir así la dosis terapéutica óptima requerida¹⁰⁴. De esta manera se minimizarían, además, los efectos adversos fuera de la zona afectada y, de este modo, sólo se tratarían/verían afectadas las células/tejidos “enfermos”. Por tanto, la aparición de células cancerígenas resistentes a múltiples fármacos sería muy reducida. Actualmente, los nanomateriales se encuentran entre los mejores candidatos para desarrollar terapias personalizadas. No obstante, el empleo de estos como transportadores de fármacos altamente selectivos no ha dado lugar a los resultados esperados hasta el momento. Revisando qué porcentaje de la concentración de partículas puede llegar a un tumor sólido en los trabajos experimentales realizados durante los últimos 10 años se observa que, en promedio, solo se acumulan en las zonas tumorales aproximadamente un 0.7% de las mismas¹⁰⁵. A pesar de este, a priori, muy bajo porcentaje de NPs que alcanzan el objetivo, los investigadores no están de acuerdo sobre si esta pequeña acumulación podría ser suficiente para ser efectiva. Según la mayoría de opiniones esta concentración sería suficiente para eliminar pequeños tumores, ya que la dosis localizada sería lo suficientemente alta, pero no así para tratar tumores de un tamaño más grande¹⁰⁶.

El interés de las MNPs como nanovehículos para el transporte y liberación de fármacos reside fundamentalmente en la facilidad con la que pueden ser dirigidas a la ROI mediante la simple aplicación de un campo magnético externo^{52,53}. Los primeros trabajos acerca del uso de MNPs en este campo de estudio datan de finales de la década de los 70^{107,108}, si bien no fue hasta los últimos años cuando se desarrollaron la gran mayoría de investigaciones al respecto. Las estructuras magnéticas sintetizadas para el transporte de fármacos pueden consistir simplemente en la unión de estos a la superficie de las MNPs mediante sencillos procesos de adsorción o de conjugación directa¹⁰⁹, aunque en estos casos la eficiencia de los citados procesos de transporte no suele ser demasiado elevada. Sin embargo, de forma habitual se preparan sistemas más complejos en los que se asegure la correcta encapsulación y posterior liberación de los citados fármacos. Así, por ejemplo, tras la unión de los fármacos a la superficie libre de las MNPs, es común crecer un recubrimiento global de un material biocompatible como,

por ejemplo, un polímero, o una capa de oro o sílice, que asegure la fijación del fármaco^{110,111}. La razón de escoger uno u otro de estos recubrimientos vendrá determinada por la afinidad con el fármaco empleado en cada caso. Los recubrimientos altamente porosos, como es el caso de la sílice, también permiten colocar las moléculas del fármaco en dichos poros en lugar de unidas directamente a la superficie de las MNPs¹¹². Otra posible aproximación consiste en encapsular una cierta cantidad de fármaco dentro de uno de estos recubrimientos y usar los poros para colocar las MNPs que luego permitirán dirigir el sistema resultante a la zona tumoral mediante la aplicación de campos magnéticos externos⁹³.

Una vez que las MNPs han sido “cargadas” con el fármaco, estas se introducen en el organismo vivo y se dirigen a la ROI mediante la aplicación de campos magnéticos externos, generados típicamente por electroimanes o imanes basados en tierras raras. Se trata, así, de una estrategia efectiva cuando se busca dirigir los sistemas a zonas tumorales no demasiado profundas, es decir, próximas a la piel. Sin embargo, dado que la fuerza magnética decae bruscamente al aumentar la distancia a la fuente, en zonas alejadas de la superficie del cuerpo es más difícil focalizar correctamente las MNPs sobre el tejido enfermo. Algunos trabajos, como los desarrollados por Yellen *et al.*¹¹³ y Kubo *et al.*¹¹⁴ proponen la implantación de pequeños imanes en las zonas tumorales profundas con los que poder dirigir las MNPs a las mismas de forma más sencilla. Cuando las MNPs con el fármaco han alcanzado la ROI la liberación de este último puede tener lugar por simple difusión o a través de mecanismos más complejos que aprovechen actividades enzimáticas alteradas o cambios en las condiciones fisiológicas tales como variaciones de pH o temperatura, los cuales también pueden ser inducidos por las propias MNPs mediante variaciones en las condiciones de los campos magnéticos aplicados. Así, por ejemplo, Chen *et al.*¹¹⁰ sintetizaron MNPs de magnetita a las que unieron en su superficie moléculas de un fármaco anticancerígeno (doxorubicina, DOXO), y compararon el comportamiento de esta estructura con el de otra en la que adicionalmente crecieron por encima una coraza de sílice porosa funcionalizada con PEG. De esta forma, comprobaron que la coraza porosa de sílice permitía llevar una mayor cantidad de fármaco a la zona tumoral y, una vez en ella, se podía controlar de forma más efectiva la liberación del mismo (Figura 1.20).

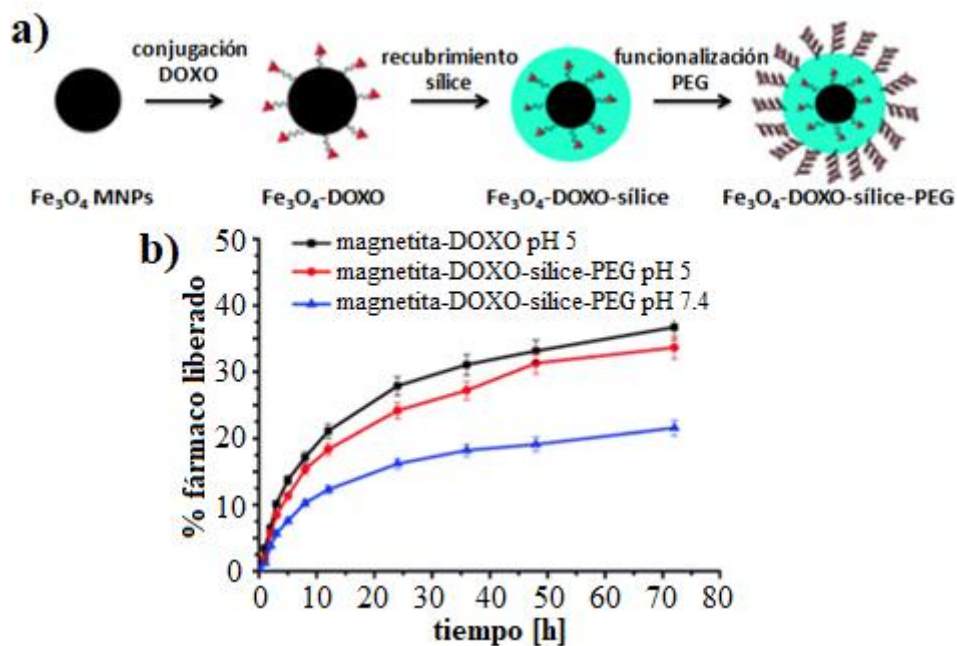


Figura 1.20: a) Representación esquemática de la construcción de nanoestructuras magnéticas cargadas con DOXO y b) curvas de liberación del fármaco. Adaptadas de la ref. 110. Copyright (2010) con permiso de *Royal Society of Chemistry*.

Yao *et al.*¹¹², por su parte, sintetizaron MNPs de magnetita de 20 nm sobre las que crecieron una capa de sílice porosa. Los poros de esta coraza fueron utilizados para cargar el fármaco, nuevamente DOXO, y sellados con NPs semiconductoras (“quantum dots”, QD) para impedir la fuga del medicamento. Los ensayos efectuados por estos investigadores demostraron la posibilidad de liberar el fármaco de forma controlada mediante variaciones en el pH que rompían las débiles interacciones electrostáticas y los puentes de hidrógeno formados entre la DOXO, los QDs y la cubierta porosa de sílice.

Varios de los medicamentos basados en MNPs aprobados actualmente por la FDA como Venoder®, Feraheme®, INFed®, Dexferrum® o Ferrlecit® se emplean en el tratamiento de la anemia relacionada con enfermedades cardíacas crónicas, cuyo principio de “funcionamiento” se basa en los principios del transporte y liberación de fármacos explicados anteriormente. Además, varios medicamentos basados en partículas de óxido de hierro se encuentran actualmente en ensayos clínicos, como por ejemplo Nanotherm™, que se encuentra en la última etapa de pruebas en Estados Unidos para el tratamiento de glioblastoma¹¹⁵. Por otra parte, recientemente, se ha comprobado la utilidad del Ferumoxytol unido a MNPs para prevenir el crecimiento

tumoral, observándose que las MNPs transportadoras son internalizadas por los macrófagos asociados a los tumores¹¹⁶. El hierro elemental desempeña un papel fundamental en este caso, ya que es el que cataliza la producción de especies oxidativas reactivas (ROS, siglas en inglés de “reactive oxygen species”) a través de la reacción de Fenton¹¹⁷. Esta reacción de Fenton se ve reforzada por la producción de radicales hidroxilo por los macrófagos polarizados tipo M1, lo que conlleva una mayor mortalidad de las células cancerosas estrechamente relacionada con el estado de polarización de este tipo de macrófagos.

II. Magnetofección y acumulación magnética

Como ya se ha comentado en el apartado previo, el uso de MNPs como transportadores presenta como gran ventaja la posibilidad de aplicar un campo magnético externo que provoque la acumulación de las MNPs en la ROI, lo que finalmente puede dar lugar a su internalización celular. Si estas MNPs se usan para transportar material genético este proceso puede utilizarse para introducir el mismo dentro de las células, en una técnica típicamente conocida como magnetofección¹¹⁸. La técnica de magnetofección (Figura 1.21) está disponible comercialmente en varias compañías (por ejemplo, Chemicell u Ozbiosciences) y es considerada una alternativa a los métodos de transfección tradicionales. Esta técnica presenta varias ventajas como la reducción del tiempo de incubación para lograr una alta eficiencia de transfección, y la capacidad de transfección a células no permisivas¹¹⁹. En la literatura se han descrito muchas aplicaciones de la magnetofección *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* con diferentes propósitos¹²⁰. Por ejemplo, esferas lipídicas con RNA de interferencia (siRNA) y MNPs en su interior fueron preparadas por del Pino *et al.*¹²¹ como vectores no virales para transfectar células. Estas lipoesferas se internalizaron por el efecto de un campo magnético externo en condiciones de flujo que imitaban el torrente sanguíneo, liberándose el material génico dentro de las células. Asimismo, también se ha comprobado que la combinación de péptidos de penetración celular y la magnetofección mejoran el grado de internalización de las MNPs bajo la aplicación de un campo magnético externo en cultivos celulares 2D¹²² y 3D¹²³.

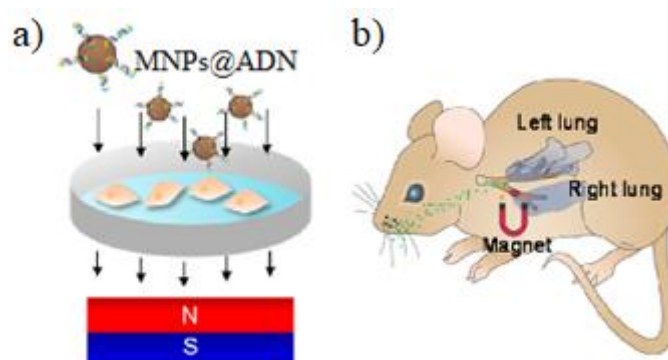


Figura 1.21: Representación gráfica de la magnetofección a) *in vitro* y b) *in vivo*¹²⁴. Reproducidas de la ref. 124. Copyright (2015) con permiso de *American Chemical Society*.

En particular, el empleo de la magnetofección *in vivo* permite el tratamiento en diferentes órganos internos de difícil acceso como el cerebro o el corazón u otros de gran tamaño como el hígado. Esta técnica se basa en la colocación de un imán cerca de la región que se desea tratar, llegando en algunos casos a ser necesaria su implantación (Figura 1.21b). La administración de las MNPs puede llevarse a cabo mediante administración sistémica o mediante administración local como, por ejemplo, una administración intratumoral directa¹²⁰. Una aplicación reciente de la magnetofección *in vivo*, desarrollada por Soto-Sánchez *et al.*¹²⁵, consiste en la transfección de plásmidos de ADN para promover la sensibilización de los canales iónicos de las neuronas que se controlarán mediante estímulos de luz (optogenética). El uso de la optogenética permite la activación selectiva de partes específicas del cerebro por la luz. El uso de la magnetofección proporciona una mayor tasa de transfección que la que se obtiene utilizando vectores virales clásicos.

III. Hipertermia (MFH)

El uso de campos magnéticos alternos para inducir incrementos de temperatura locales es otra gran aplicación terapéutica de las MNPs. En general, hablamos de un tratamiento de hipertermia cuando la temperatura de los tejidos que se quieren tratar se eleva a temperaturas en las que se destruyen las células tumorales (por encima de los 47 °C, denominada ablación térmica), o bien cuando se logra que su sensibilidad a otros tratamientos tales como radioterapia o quimioterapia se incremente (40-45 °C, sensibilización térmica)¹²⁶. La sensibilización de los tejidos tratados se debe al aumento

del flujo sanguíneo gracias a la mayor permeabilidad vascular inducida por el incremento de la temperatura local. Esto conduce a una disminución de la hipoxia en la región, lo que se ha demostrado que promueve los efectos citotóxicos de muchos fármacos contra el cáncer¹²⁷. Asimismo, este efecto también es una consecuencia directa de la menor capacidad de respuesta de las células tumorales al aumento de la temperatura¹²⁸. A nivel celular, este incremento produce cambios en la configuración de las proteínas, en la actividad enzimática y en el crecimiento y la diferenciación de las células^{129,130}. De esta forma, la combinación de hipertermia y radio- o quimioterapia ha demostrado ser beneficiosa para los pacientes, al mejorar las tasas de supervivencia en muchos tipos de cáncer (por ejemplo, cuello uterino, vejiga, cerebro, etc.)^{126,131}.

El proceso de aumento de la temperatura en un tejido se puede lograr usando un enfoque de "adentro hacia afuera" o de "afuera hacia adentro", dependiendo de dónde se encuentre la fuente de calor. En el caso que nos ocupa, donde las MNPs se acumulan o se inyectan en el tumor, la producción de calor se debe al calentamiento de las MNPs que ocurre dentro de los tumores (es decir, adentro hacia afuera)¹²⁶. La hipertermia de "afuera hacia adentro", producida por radiofrecuencias, microondas o métodos de ultrasonidos tiene varios inconvenientes como la distribución no homogénea de temperatura¹³², lo que puede dar lugar a puntos calientes que causen daños en tejidos sanos. Otro inconveniente de estos métodos es la imposibilidad de alcanzar las temperaturas terapéuticas requeridas en tumores profundos. El empleo de MNPs para hipertermia se conoce generalmente como hipertermia de fluidos magnéticos (MFH, siglas en inglés de "magnetic fluid hyperthermia") y se basa, a muy grandes rasgos, en la capacidad de las MNPs de absorber energía de un campo magnético y convertirla en calor.

Tradicionalmente, las MNPs utilizadas en los ensayos de MFH suelen presentar comportamiento superparamagnético. La razón principal, como se ha explicado anteriormente, es que las partículas en este régimen no presentan áreas importantes en sus ciclos de histéresis bajo un campo magnético continuo (su magnetización remanente es nula), lo que da lugar a que no tengan tendencia a formar agregados una vez retirado el mismo. En lo referente a la capacidad hipotérmica de estos sistemas, esta es debida principalmente a las pérdidas por histéresis que se originan al aplicar un campo magnético de carácter alterno, así como, en menor medida, a la interacción entre las MNPs y el campo magnético aplicado, que da lugar a los llamados fenómenos de

relajación de Néel y de Brown¹². La relajación de Néel consiste, a muy grandes rasgos, en la reorientación de los momentos magnéticos de las MNPs, rotando estos con respecto a la red cristalina, sin que esto implique un movimiento físico de las mismas. Por su parte, la relajación de Brown tiene su origen en la fricción de las MNPs al rotar físicamente en un medio viscoso, manteniéndose en este caso su momento magnético fijo con respecto a la estructura interna. Nótese que para que estos fenómenos sean relevantes, como ya fue mencionado, el campo magnético aplicado ha de ser alterno, ocasionando sucesivos cambios de dirección de los momentos magnéticos y movimientos físicos de las MNPs. Ambas relajaciones, sin campo magnético aplicado, pueden ser cuantificadas a través de los tiempos de relajación de Néel, ya mencionado en el apartado 1.1.2 (ecuación 1.8) y de Brown (ecuación 1.9), a partir de los cuales se puede calcular el tiempo de relajación efectivo¹³³ (ecuación 1.10):

$$\tau_N = \tau_0 \cdot e^{\frac{K \cdot V}{K_B T}} \quad (1.8)$$

$$\tau_B = \frac{\pi \eta d^3}{2 K_B T} \quad (1.9)$$

$$\tau_{eff} = \frac{\tau_B \cdot \tau_N}{\tau_B + \tau_N} \quad (1.10)$$

siendo $\tau_0 \sim 10^{-9}$ s, KV la altura de la barrera de energía de anisotropía de la partícula, K_B la constante de Boltzmann, η la viscosidad del medio líquido de dispersión, d el diámetro hidrodinámico de las MNPs y T la temperatura.

Generalmente, la relajación de Néel es el fenómeno dominante en MNPs de tamaño muy reducido, aumentando la importancia de la relajación browniana a medida que se aumenta el tamaño de los nanosistemas¹³⁴ (Figura 1.22). Por su parte, mediante simulaciones computacionales se ha determinado que para bajos campos magnéticos alternos aplicados la relajación de Néel tiene más peso que la de Brown a elevadas frecuencias y amplitudes de campo¹³⁵. Así pues, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas, las MNPs superparamagnéticas responden a un campo magnético externo alterno absorbiendo una energía que se puede convertir en calor^{133,136}.

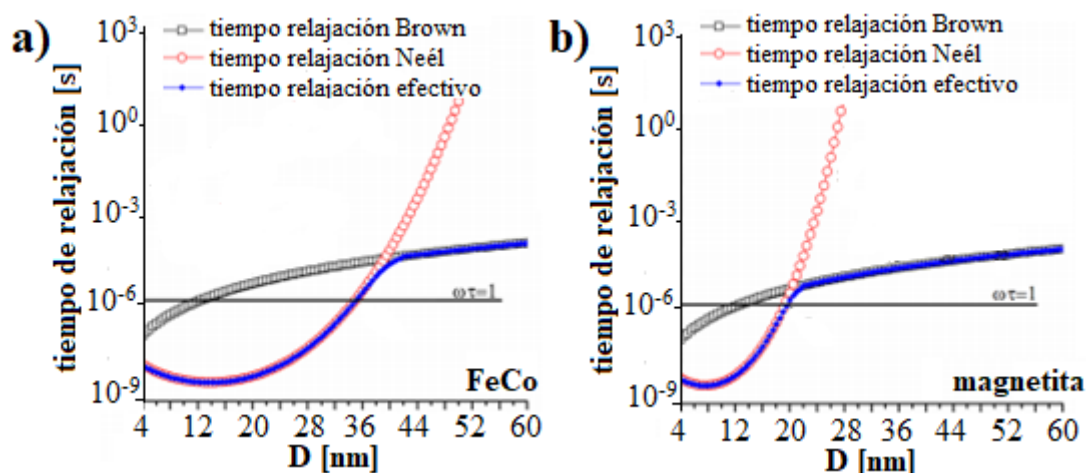


Figura 1.22: Simulación teórica de los tiempos de relajación de Néel, Brown y efectivo en MNPs de a) FeCo y b) Fe_3O_4 en función del tamaño de las mismas. Adaptadas de la ref.134. Copyright (2017) con permiso de *Springer Verlag*.

Las MNPs ferro- o ferrimagnéticas, al presentar ciclos de histéresis de área no nula bajo un campo continuo, tienen una mayor capacidad de absorber energía de un campo magnético aplicado y, por tanto, mayor potencial como agentes hipertérmicos. Sin embargo, la existencia de esta magnetización remanente también provoca la tendencia de las MNPs a agregarse, lo cual supone un gran inconveniente de cara a sus potenciales aplicaciones biológicas^{137,138}. Las MNPs ferro- o ferrimagnéticas de tamaño reducido, ligeramente por encima del tamaño de transición a régimen superparamagnético, presentan unas características particularmente interesantes para tratamientos de hipertermia magnética debido al compromiso existente entre su importante capacidad de generación de calor y su tendencia a la agregación controlable al aplicar campos magnéticos externos.

La cantidad de calor producida por las MNPs se expresa mediante la llamada tasa de absorción específica (SAR, siglas en inglés de “specific adsorption rate”), también conocida como potencia de pérdida específica (SLP, siglas en inglés de “specific loss power”). El SAR se define como la potencia absorbida por unidad de masa de MNPs bajo un campo magnético alterno aplicado de frecuencia e intensidad determinadas⁴⁷.

$$SAR = \frac{\text{potencia absorbida}}{\text{masa de MNPs}} \quad (1.11)$$

El SAR es una magnitud que depende de múltiples factores como, por ejemplo:

- i) *La concentración de MNPs*; esta puede ser expresada en relación al contenido de Fe (o demás átomos magnéticos) o bien en relación a la masa total de MNPs, es decir, teniendo también en cuenta la contribución de los átomos de oxígeno y del recubrimiento.
- ii) *La frecuencia y la intensidad del capo magnético alterno aplicado.*
- iii) *Las propiedades físico-químicas de las MNPs.*
- iv) *El medio donde se encuentran dispersas las MNPs.*
- v) *El grado de aglomeración de las MNPs.*

Para su aplicación clínica, se han tratado de establecer algunos límites en los tratamientos de hipertermia como, por ejemplo, el valor máximo del producto de la intensidad de campo magnético alterno aplicado (H) por la frecuencia (f). Brezovich *et al.*¹³⁹ fijaron este límite en $H \cdot f < 4.85 \cdot 10^8 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, basándose en las corrientes que, al sobrepasarlo, comenzaban a inducirse en los tejidos debido a la aplicación del campo magnético. Este valor, sin embargo, representaba una fuerte limitación en aplicaciones terapéuticas, puesto que solo permitía la aplicación de campos de baja intensidad y frecuencia. Hergt *et al.*¹⁴⁰ incrementaron este valor máximo a $H \cdot f < 5.5 \cdot 10^9 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, basándose en la misma razón de la intensidad de las corrientes magnéticas inducidas. Estos valores, sin embargo, deben ser tomados solo como una referencia y pueden ser ligeramente excedidos si la combinación de la amplitud y frecuencia de campo magnético empleados no dan lugar a importantes problemas relacionados con las ya mencionadas corrientes magnéticas que se generan. En los diversos estudios publicados hasta la fecha, los valores típicos empleados se encuentran por debajo de 900 kHz para la frecuencia y por debajo de $30 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ para las amplitudes de campo¹⁰⁰, de forma que en muchas ocasiones se exceden los valores máximo del producto entre ambas magnitudes antes mencionados. En la Tabla 1.3 se indican los valores de intensidad y frecuencia del campo magnético alterno empleados para medir el SAR en diferentes trabajos relevantes previamente publicados.

Tabla 1.3: Valores de intensidad, frecuencia del campo magnético y producto de ambas magnitudes implementados en mediciones del SAR en diferentes estudios de hipertermia magnética.

Autores del trabajo	H [kA·m⁻¹]	f [KHz]	H·f [A·m⁻¹·s⁻¹]
Jang <i>et al.</i> ²⁴	3.7	500	1.85·10 ⁹
Zhang <i>et al.</i> ⁴⁶	24.0	412	9.89·10 ⁹
Tanimoto <i>et al.</i> ¹⁴¹	6.5	300	1.95·10 ⁹
Guardia <i>et al.</i> ¹⁴²	20.0	520	1.04·10 ¹⁰
Guardia <i>et al.</i> ¹⁴³	32.0	300	9.60·10 ⁹
Di Corato <i>et al.</i> ¹⁴⁴	24.0	600	1.20·10 ¹⁰
Sathya <i>et al.</i> ¹⁴⁵	32.0	105	3.36·10 ⁹
Casula <i>et al.</i> ¹⁴⁶	24.0	105	2.52·10 ⁹

Experimentalmente, el SAR se mide en un equipo en el que la muestra se coloca dentro de una bobina refrigerada, a fin de evitar problemas de sobrecalentamiento¹⁴⁷ (Figura 1.23). El portamuestras debe ser adiabático para facilitar los cálculos. Si el diseño experimental efectuado cumple los requisitos, se puede aplicar la siguiente expresión para obtener el SAR⁴⁶:

$$SAR = \frac{C_{media} \cdot \rho_{media}}{\rho_{MNPs}} \cdot \frac{dT}{dt} \quad (1.12)$$

dónde C_{media} es la capacidad calorífica del medio donde la muestra está dispersa (por ejemplo, en el caso del agua, 4.2 J·g⁻¹·K⁻¹), ρ_{media} es la densidad de este mismo medio de dispersión (1 g·cm⁻³ en el caso del agua), ρ_{MNPs} es la densidad de la parte inorgánica de las MNPs en g·cm⁻³, y dT/dt es la pendiente de la curva de calentamiento durante los primeros segundos.

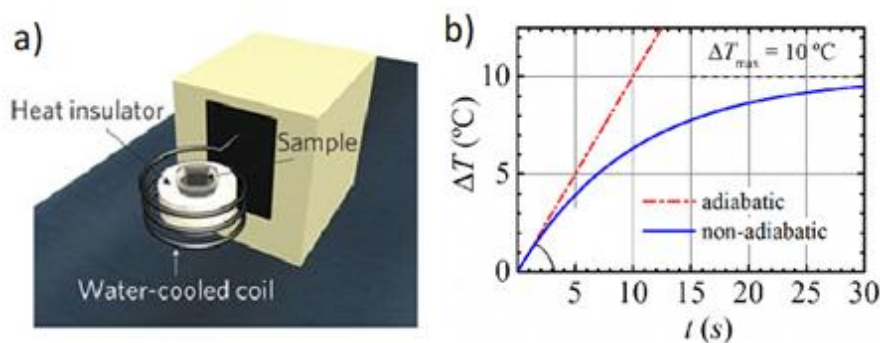


Figura 1.23: a) Esquema del montaje experimental para medir el SAR, con la bobina de inducción magnética dentro de la cual se coloca la muestra, refrigerada con agua y con un elemento aislante de calor. Reproducida de la ref. 145 Copyright (2015) con permiso de *AIP Publishing*. b) Curvas de temperatura frente a tiempo en un sistema adiabático y en un sistema no adiabático. Reproducidas de la ref. 47. Copyright (2011) con permiso de *Nature Publishing Group*.

Observando la ecuación 1.12 es fácil darse cuenta de que el medio de dispersión afecta de forma importante a la medición del SAR de las MNPs. A este respecto, Di Corato *et al.*¹⁴⁴ estudiaron la variación de las propiedades de las MNPs inmersas en medios celulares. Para hacerlo, seleccionaron diferentes tipos de MNPs sintetizadas por diferentes rutas y analizaron sus propiedades magnéticas observando que, en general, las MNPs pierden capacidad de calentamiento tras la internalización celular, probablemente como consecuencia de la pérdida de espacio para moverse dentro de las células. Estos resultados están en consonancia con otros estudios en los que el movimiento de las MNPs se restringía físicamente⁴⁶.

Por otro lado, se han realizado numerosos estudios para averiguar cuál es el incremento de temperatura real que las MNPs son capaces de producir mediante su excitación con un campo magnético externo aplicado. En uno de ellos, Dias *et al.*¹⁴⁸ modificaron MNPs con oligonucleótidos de diferentes longitudes con el fin de medir cuál era la eficacia de liberación de cada uno de estos tras la exposición al campo magnético externo. Los resultados obtenidos indicaron que las MNPs actuaron efectivamente como “nanocalentadores” que provocaban la liberación de las cadenas de oligonucleótidos incluso cuando la temperatura global estaba 10 °C por debajo de la temperatura de fusión de las hebras de los oligonucleótidos. Así, usando esta metodología se determinaron los incrementos de temperatura a distancias específicas de

la superficie de las MNPs, estando estos en concordancia con los obtenidos por Riedinger *et al.*¹⁴⁹ utilizando enlaces sensibles a la temperatura para evaluar el aumento local de la misma.

A pesar de los problemas, ya mencionados previamente, relacionados con la dificultad de conducir las MNPs a tejidos profundos o con la generación no uniforme de calor, el uso de MFH como herramienta terapéutica en el tratamiento de tumores ha sido satisfactoriamente comprobada *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* con resultados prometedores. Un claro ejemplo son los trabajos centrados en el tratamiento de los gliomas. El glioblastoma es el glioma más maligno y, aunque la incidencia de este tipo de cáncer es relativamente baja (alrededor de 1.79%), lleva asociada una alta tasa de mortalidad¹⁵⁰. Así, Silva *et al.*¹²⁹ presentaron los resultados obtenidos por diferentes investigadores en el tratamiento del glioma. En estos trabajos se utilizaron principalmente liposomas de magnetita y MNPs de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIONs) recubiertas con aminosilanos, y los experimentos incluyeron estudios *in vitro*, modelos animales con la implantación de tumores y dos estudios clínicos, concluyéndose que la generación de calor mediante MFH combinada con otros tratamientos daba lugar a la correcta eliminación del tejido tumoral. En base a estos estudios, la compañía Magforce ha recibido la aprobación para tratar pacientes con glioma mediante MFH usando sistemas basados en MNPs de óxido de hierro de 15 nm de diámetro, los cuales ya están implementados en seis hospitales de Alemania. Además, esta empresa está llevando a cabo otros ensayos clínicos para, por ejemplo, el tratamiento de cáncer de próstata usando estas mismas MNPs.

De la misma manera, empleando MNPs más complejas con estructura núcleo-coraza con núcleo de óxido de hierro dopado con cobalto y coraza de óxido de hierro dopada con manganeso se ha conseguido también la remisión de tumores *in vivo* por ablación térmica⁴⁷. Estas estructuras presentan un valor de SAR extremadamente alto, de aproximadamente 2280 W·g⁻¹ (Figura 1.24), estando entre los más elevados que se han registrado.

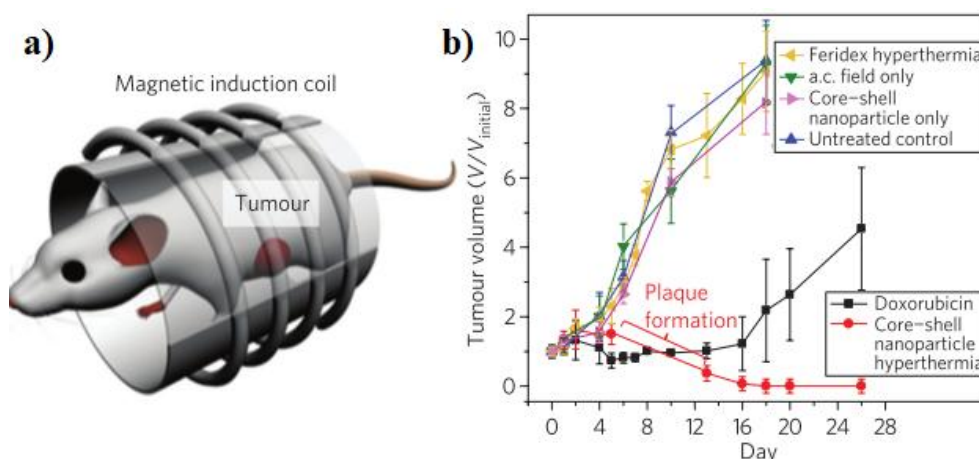


Figura 1.24: a) Esquema de montaje MFH para modelos animales. b) Evolución del tamaño del tumor en el animal tras los diferentes tratamientos mediante MFH y consiguiente liberación del fármaco DOXO. Reproducidas de la ref. 47. Copyright (2011) con permiso de *Nature Publishing Group*.

A pesar de todos estos prometedores resultados, se ha demostrado que cualquier tratamiento único contra el cáncer es ineficaz para eliminar el tejido tumoral en su totalidad y, especialmente, para combatir la metástasis. Por lo tanto, se están explorando terapias combinadas que empleen dos o más formas de tratamiento¹⁵¹. Así, la combinación de la MFH con la quimioterapia ha proporcionado resultados esperanzadores. Por ejemplo, Kolosnjaj-Tabiet *et al.*¹⁵² estudiaron el efecto de nanocubos de óxido de hierro de aproximadamente 19 nm de diámetro recubiertos con PEG y cargados con el fármaco antineoplásico DOXO para inducir la destrucción tumoral (en este caso, carcinoma epidérmico). Se observó que después de una inyección intratumoral directa de los nanocubos y la aplicación de MFH, las MNPs eran responsables de la destrucción del microambiente tumoral, de la disminución del crecimiento del tumor y del aumento de la sensibilidad del mismo al fármaco antitumoral. En otro estudio, Lee *et al.*¹⁵³ obtuvieron resultados similares utilizando sistemas más complejos, esto es, sintetizando MNPs supramoleculares cargadas con DOXO. Estas NPs se formaron por la aglomeración de NPs de 6 nm de $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$ en agregados de aproximadamente 160 nm que encerraban el fármaco. Estos agregados mostraron capacidades excepcionales de calentamiento ante la aplicación de campos magnéticos y una importante desaceleración del crecimiento tumoral, efecto que se mejoró con la liberación controlada de la citada DOXO. En otra aproximación reciente, Espinosa *et al.*¹⁵⁴ han estudiado el potencial de los nanocubos de óxido de hierro para

que actúen como inductores de calentamiento al ser excitados tanto por campos magnéticos como por pulsos de luz. Este podría ser el comienzo de una terapia dual de hipertermia inducida por campos magnéticos y luz que permitiría minimizar posibles daños colaterales adversos. Sin embargo, este tipo de terapias combinadas aún se encuentra en fases preliminares, y son necesarios más estudios básicos para entender cómo estos materiales afectan al microambiente tumoral y, así, mejorar la eficiencia y eficacia de los mismos.

IV. Imagen por resonancia magnética (MRI)

La imagen por resonancia magnética (MRI, siglas en inglés de “magnetic resonance imaging”) es la principal herramienta anatómica utilizada en el diagnóstico clínico, incluido el diagnóstico del cáncer, capaz de convertir la señal de magnetización nuclear en imágenes 2D. Es una técnica no invasiva y sin radiación, basada en el mismo principio que la resonancia magnética nuclear (RMN), que presenta un contraste mejorado de los tejidos blandos que permite una alta resolución espacial¹⁵⁵. El principio fundamental de la MRI consiste en la aplicación de un campo magnético fijo a lo largo de un eje (B_0) para dar una dirección estable a la magnetización de los núcleos de hidrógeno presentes en los tejidos, seguida de la aplicación de una serie de pulsos de campo magnético perpendiculares durante un tiempo específico para rotar dicha magnetización. Finalmente, se detienen estos pulsos magnéticos permitiendo que los núcleos ^1H ubicados en la zona de interés recuperen el equilibrio según la dirección del campo B_0 . La magnetización es medida en la dirección longitudinal y en el plano transversal al campo magnético aplicado desde un inicio, dando lugar a las señales de contraste T_1 y T_2 , respectivamente, a partir de las cuales se generan las imágenes de resonancia magnética en escala de grises. Los campos magnéticos inicialmente aplicados son de elevada intensidad (entre 1.5 y 3 T se encuentran los campos usados en la práctica clínica), de modo que los espines nucleares de los átomos de hidrógeno están orientados en el mismo sentido que el campo magnético (estado de menor energía) o en sentido opuesto (estado de mayor energía). Los núcleos que adquieren un estado de mayor energía después de ser irradiados por pulsos de ondas electromagnéticas de radiofrecuencia perpendiculares al campo B_0 regresan al estado de equilibrio en un proceso denominado relajación, que puede ocurrir mediante dos tipos diferentes de

mecanismos: relajación longitudinal (relajación espín-red) y relajación transversal (relajación espín-espín)¹²⁴. El tiempo de relajación longitudinal (T_1) representa el tiempo requerido para la recuperación de la magnetización longitudinal (desde el mínimo a un valor de 63 % del estado original), mientras que el tiempo de relajación transversal (T_2) representa el tiempo para que la magnetización transversal disminuya desde el máximo hasta un valor del 37% de su estado excitado¹⁵⁶ (Figura 1.25).

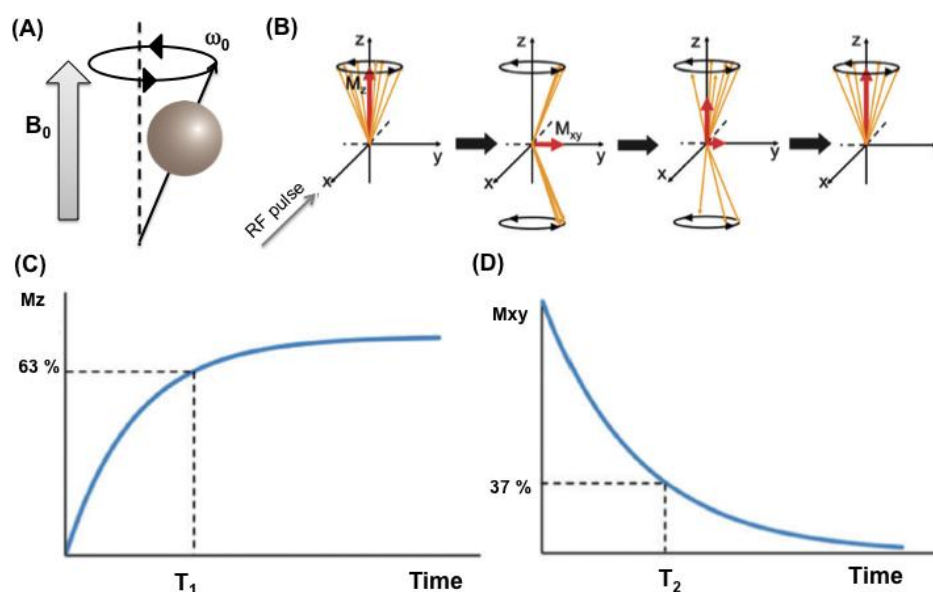


Figura 1.25: a) Los espines nucleares de los núcleos de hidrógenos se alinean paralela o antiparalelamente al campo externo aplicado (B_0). b) Después de irradiar con una radiofrecuencia resonante perpendicular la magnetización longitudinal (M_z) decrece y aparece una magnetización transversal (M_{xy}). c) T_1 es el tiempo que M_z tarda en recuperar el 63% de su valor de equilibrio. d) T_2 es el tiempo que M_{xy} tarda en caer al 37% de su valor inicial. Reproducidas de la ref. 155. Copyright (2012) con permiso de *Royal Society of Chemistry*.

Cuanto más rápida sea la relajación de T_1 , más brillante será la imagen de T_1 , mientras que cuanto más rápida sea la relajación T_2 , más oscura será la imagen de T_2 y viceversa. En general, la MRI ponderada en T_1 es útil para evaluar tejidos grasos o ciertas estructuras retenedoras de líquidos, mientras que la MRI ponderada en T_2 es adecuada para evaluar estructuras con alto contenido en agua o inflamaciones locales¹⁵⁷ (Figura 1.26).

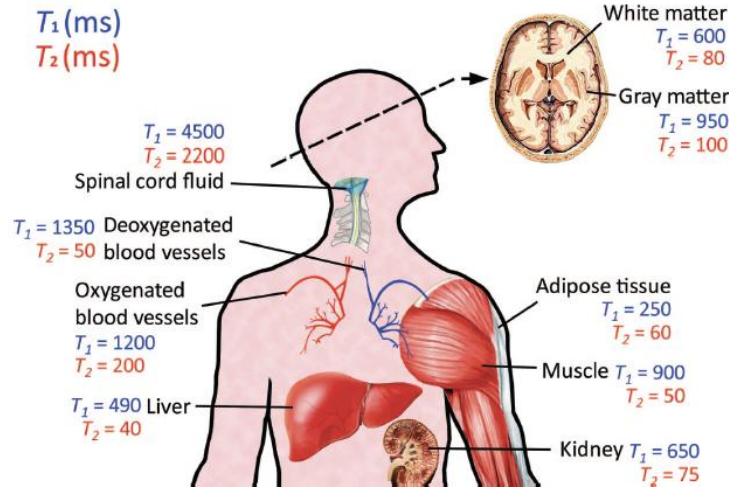


Figura 1.26: Tiempos de relajación T_1 y T_2 de diferentes tejidos del cuerpo humano medidos bajo la aplicación de un campo magnético de 1.5 T. Reproducida de la ref. 156. Copyright (2011) con permiso de *American Chemical Society*.

El principal inconveniente que presenta esta técnica de imagen es que no siempre el contraste generado es suficiente para efectuar un diagnóstico preciso. Para ello, y a pesar de que la densidad de protones en un determinado tejido es fija, la administración de un agente de contraste puede modificar las velocidades de relajación magnética nuclear de los protones de su entorno^{158,159,160}. La mejora de la señal producida por un agente de contraste depende de sus coeficientes de relajación longitudinal y transversal (r_1 y r_2 , respectivamente), que se definen en base a la variación de las tasas de relajación $R_1 = T_1^{-1}$ y $R_2 = T_2^{-1}$, respectivamente. Así, un agente de contraste puede ser categorizado como agente de contraste T_1 ó T_2 en base a sus características de relajación.

La eficacia de un agente de contraste de imagen de resonancia magnética se determina mediante la siguiente expresión:

$$R_i = \frac{1}{T_{i,0}} + r_i \cdot C \rightarrow r_i = \frac{1}{C} \cdot \left(\frac{1}{T_i} - \frac{1}{T_{i,0}} \right) \quad (1.13)$$

dónde $R_i = 1/T_i$ es la tasa de relajación observada (s^{-1}), $T_{i,0}$ es el tiempo de relajación antes de haber añadido el agente de contraste (s), r_i es el coeficiente de relajación ($mM^{-1}s^{-1}$), y C es la concentración del agente de contraste utilizado (mM). El coeficiente de

relajación (r_i) es el indicador de la mejora del contraste, que se obtiene calculando la pendiente de la gráfica de R_i frente a la concentración molar del agente de contraste¹⁵⁶.

Los agentes de contraste positivos (o T_1) aumentan la velocidad de recuperación de la magnetización longitudinal, acortando así el tiempo de relajación T_1 y produciendo señales más brillantes. Por su parte, los agentes de contraste negativos (o T_2) aumentan la velocidad de decrecimiento de la magnetización transversal y acortan el tiempo de relajación T_2 , generando un oscurecimiento de la señal en la MRI. No obstante, la señal producida por los agentes de contraste T_2 a veces puede confundirse con factores endógenos como hemorragias, aire o coágulos sanguíneos.

El uso de compuestos magnéticos como agentes de contraste para MRI ha tenido un impacto significativo en las aplicaciones clínicas de esta técnica¹⁶⁰. En particular, las SPIONs han sido ampliamente estudiadas como agentes de contraste MRI en la detección de cánceres y en enfermedades cardiovasculares e inflamatorias¹⁶¹. Estas nanoestructuras son candidatas prometedoras para sustituir a los agentes de contraste tradicionales basados en gadolinio: típicamente las SPIONs tienen unos coeficientes de relajación r_2 y r_1 aproximadas de $100 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $30 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente, valores sustancialmente más grandes que los agentes de los agentes de contraste basados en gadolinio que presentan unos valores aproximados de $6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para r_2 y de $4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para r_1 ^{159,162}, respectivamente.

Además, las MNPs de tamaño muy reducido presentan grandes ventajas como agentes de contraste MRI para su aplicación en el diagnóstico del cáncer, debido a su adecuado valor de magnetización de saturación y a sus propiedades superparamagnéticas¹⁶³. Como se explicó con anterioridad, las MNPs con comportamiento superparamagnético se caracterizan por no presentar magnetización remanente cuando se elimina el campo magnético externo y, por lo tanto, su magnetización se puede activar y desactivar. Se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se emplearon SPIONs para la mejora del contraste MRI a fin de lograr un diagnóstico preciso¹⁶⁴. Ajustando las características de las SPIONs, tales como el tamaño, la forma¹⁶⁵, el recubrimiento superficial¹⁶⁶ o la composición de sus núcleos inorgánicos (reemplazando los iones Fe^{2+} por otros iones metálicos de transición divalentes como Mn^{2+} , Zn^{2+} , etc.)¹⁶⁷ es posible modificar sus propiedades magnéticas, tales como la magnetización de saturación o la constante de anisotropía magnética, que

desempeñan papeles importantes en el proceso de relajación de los protones del agua situados en su entorno¹⁶². Las SPIONs presentan un alto valor de relajación R_1 , y también dan lugar a una gran variación en el campo magnético local, lo que se traduce en una mejora de la relajación de R_2 ^{168,169} (Figura 1.27). Así, modificando el tamaño de las NPs, estas pueden usarse bien como agentes de contraste T_1 biocompatibles o bien como agente de contraste T_2 ultra sensibles.

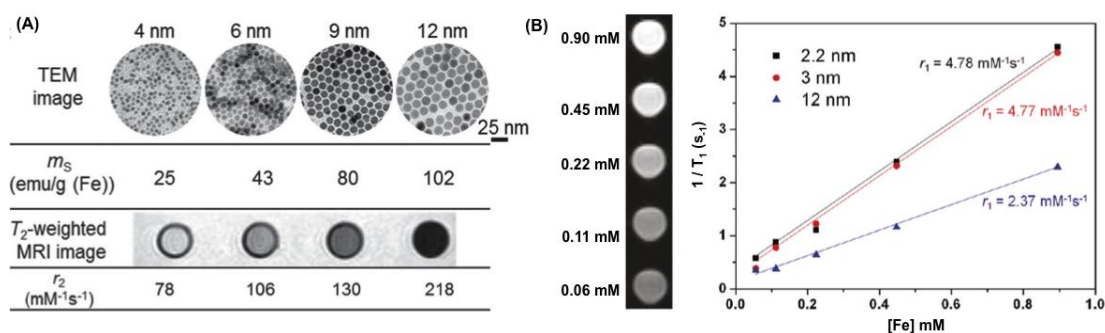


Figura 1.27: Aumento de la magnetización de saturación y del coeficiente r_2 al aumentar el tamaño de las MNPs. Reproducida de la ref. 167. Copyright (2005) con permiso de *American Chemical Society*. b) Imágenes de MRI en T_1 de SPIONs de 3 nm y representación gráfica de $1/T_1$ frente a concentración de Fe en SPIONs de 12.0, 3.0, y 2.2 nm. Reproducida de la ref. 168. Copyright (2011) con permiso de *American Chemical Society*.

A pesar de que pueden ser usadas como agentes de contraste tanto en T_1 como en T_2 , las MNPs suelen dar lugar a mayores incrementos en la tasa de relajación R_2 , por lo que la mayoría de los agentes de contraste para MRI basados en MNPs de óxido de hierro se detectan mediante una pérdida de señal en las imágenes ponderadas en T_2 ¹⁶⁸. Es decir, gracias a su alta susceptibilidad magnética, las SPIONs pueden ser identificadas como señales más oscuras en las imágenes de resonancia magnética, lo que las convierte en agentes de contraste T_2 adecuadas. El valor de r_2 para las SPIONs suele ser al menos cinco o diez veces mayor que el valor de r_1 ¹⁷⁰, y un aumento en su tamaño implica, por lo general, un aumento en el valor de r_2 . Así, se han empleado MNPs de óxido de hierro de tamaño micrométrico (con diámetros de varias micras) como potenciales agentes de contraste T_2 , consiguiendo llegar a visualizar células individuales¹⁷¹. Además, otros compuestos como partículas de óxido de hierro reticuladas¹⁷² o ensamblajes de estructuras de SPIONs (por ejemplo, aglomerados de NPs de óxido de hierro controlados mediante polímeros, recubrimientos con sílice o

encapsulación con micelas)^{173,174} pueden modular sus relaciones r_2 / r_1 para mejorar la señal T_2 .

Finalmente, además del tamaño, forma, composición, etc., la superficie de las MNPs influirá altamente en su estabilidad coloidal, biocompatibilidad y funcionalidad específica. El recubrimiento superficial juega, por tanto, un papel crucial en la capacidad de focalización de los sistemas y en su efecto sinérgico para las modalidades de imagen dual y estrategias terapéuticas^{166,175}.

V. Imagen multimodal

La MRI se ha demostrado como una metodología con un gran potencial para obtener imágenes anatómicas de alta resolución y contraste, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, esta técnica por sí sola no proporciona una información completa sobre el tejido estudiado, por lo que su combinación con otras técnicas de imagen diagnóstica es crucial para la obtención de un conocimiento total de la zona de interés. La implementación conjunta de MRI con otros métodos como fluorescencia óptica, tomografía computacional (CT, siglas en inglés de “computational tomography”) o tomografía de emisión de positrones (PET, siglas en inglés de “positron emission tomography”) ha mostrado un gran potencial de cara al diagnóstico preciso del cáncer^{176,177}. Las MNPs pueden ser conjugadas con diferentes componentes, tales como moléculas fluorescentes o radioisótopos, de forma que las estructuras resultantes pueden ser usadas como herramientas para generar señales de diferentes formas de imagen multimodal¹⁷⁸. Las propiedades magnéticas inherentes de las MNPs, sin ser estas necesariamente modificadas, también pueden ser empleadas como fuente para la obtención de imágenes como sucede, por ejemplo, en las imágenes magneto-fotoacústicas (MPA, siglas en inglés de “magneto photo-acoustic”), en las imágenes de partículas magnéticas (MPI, siglas en inglés de “magnetic particle imaging”) o en las imágenes de ultrasonidos-magnéticas (MUS, siglas en inglés de “magnetic ultrasound”), técnicas que también pueden ser combinadas con MRI a fin de obtener la mayor información posible de los tejidos estudiados. Se explicará a continuación de forma breve como se implementa el uso de MNPs en distintas técnicas de imagen multimodal.

La CT ofrece imágenes de una alta resolución y no presenta límites en lo que al grado de penetración en el tejido de interés se refiere, por lo que es una de las técnicas más habitualmente empleada en la práctica clínica. Se basa, a muy grandes rasgos, en irradiar los tejidos con haces de rayos X y estudiar los diferentes grados de atenuación que sufren estos en función de las densidades y demás propiedades de dichos tejidos. Presenta la gran ventaja de que es una técnica de muy rápida aplicación pero, como contrapartida, muchas veces no proporciona imágenes de resolución lo suficientemente alta cuando se analizan tejidos blandos como cartílagos o ligamentos, en los que las imágenes MRI sí tienen una elevada calidad. La combinación de las MNPs con yodo, oro o lantánidos da lugar a estructuras que permiten la obtención de imágenes bimodales CT-MRI, las cuales ofrecen precisa información acerca de la estructura de toda clase de tejidos o zonas tumorales^{179,180}.

Por su parte, la modificación de MNPs con compuestos activos ópticamente (típicamente marcadores fluorescentes) produce sistemas que pueden ser utilizados para la obtención de imágenes bimodales óptico-MRI¹⁸¹. Las grandes ventajas de estos compuestos residen en la posibilidad de obtener imágenes multicolor, así como en la simplicidad de su uso, teniendo como importante contrapartida su baja capacidad de penetración en los tejidos. Recientemente, por ejemplo, se sintetizaron MNPs modificadas con un marcador fluorescente (Cy5.5) que permitieron obtener imágenes bimodales de tumores cerebrales de muy alta resolución¹⁸² (Figura 1.28a). La modificación de estructuras sobreconvertoras con MNPs de óxido de hierro (Figura 1.28b), por otra parte, también dio lugar a sistemas que sirvieron para obtener imágenes bimodales de este tipo de alta precisión de tejido linfático mediante inyecciones intravenosas y subcutáneas de las nanoestructuras generadas^{183,184}.

La acción combinada de técnicas de obtención de imagen basadas en radioisótopos, tales como PET o la tomografía computarizada de emisión de fotones (SPECT, siglas en inglés de “single photon emission computed tomography”) con MRI da lugar a imágenes de alta resolución, aumentando además el grado de penetración en los tejidos que presenta esta última técnica al ser usada por sí sola¹⁸⁵. Este tipo de imágenes multimodales se basan en el empleo de MNPs modificadas con isótopos radioactivos que son inyectadas en el flujo sanguíneo y acumuladas en la región de interés. Así, por ejemplo, MNPs de óxido de hierro unidas a radioisótopos ^{64}Cu (Figura 1.28c)¹⁸⁶ o ^{99}Tc (Figura 1.28d)¹⁸⁷, respectivamente, han sido empleadas para la

monitorización de regiones tumorales, obteniéndose imágenes bimodales o trimodales PET-SPECT-MRI de ganglios linfáticos, órganos cardiovasculares o hígado de elevada precisión. Esta técnica de imagen multimodal presenta, sin embargo, diversos inconvenientes como la radiación a la que se debe someter al paciente.

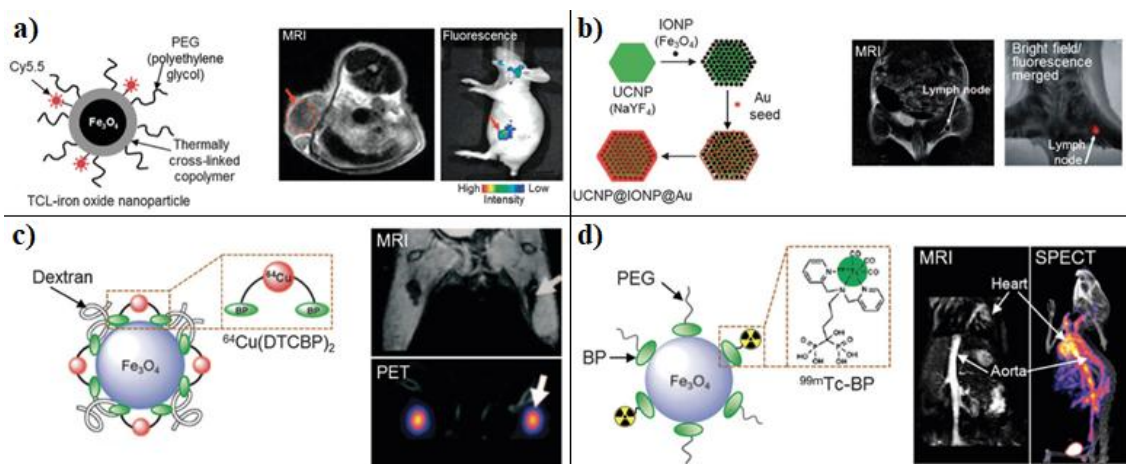


Figura 1.28: a) MNPs de magnetita con el marcador fluorescente Cy5.5. Reproducida de la ref. 181. Copyright (2007) con permiso de *American Chemical Society*; b) estructuras híbridas basadas en NPs sobreconversoras modificadas con MNPs y NPs de oro usadas como agentes de imagen bimodales óptico-MRI para detección tumoral. Reproducida de la ref. 182. Copyright (2011) con permiso de *Wiley-Blackwell*. c) MNPs de magnetita marcadas con radioisótopos ^{64}Cu y el quelante DTCBP. Reproducida de la ref. 185. Copyright (2011) con permiso de *Wiley-Blackwell*. d) MNPs marcadas con radioisótopos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ como agentes de imagen bimodales PET-MRI y SPECT-MRI para la observación de ganglios linfáticos y el sistema cardiovascular. Reproducida de la ref. 186. Copyright (2013) con permiso de *American Chemical Society*.

Por otro lado, la MPI es una técnica cuantitativa que permite visualizar directamente la distribución espacial de las MNPs, dando lugar a imágenes de alto contraste y sensibilidad. Se basa en la medición de las señales electromagnéticas generadas por las MNPs, ya acumuladas en la zona de interés, tras ser sometidas a un campo magnético¹⁸⁸. Algunas MNPs superparamagnéticas disponibles comercialmente como Resovist han sido evaluadas como agentes para la obtención de imágenes bimodales MPI-MRI. La técnica MPI no presenta límites respecto al grado de penetración en el tumor y su combinación con MRI da lugar a imágenes anatómicas de elevada calidad. Recientemente, se han realizado estudios de detección de cánceres mediante MPI-MRI con prometedores resultados¹⁸⁹.

Por último, la técnica de imagen por ultrasonidos (US) se fundamenta en la detección de las ondas ultrasónicas emitidas por los tejidos después de que estos absorban un pulso de láser y se expandan termoelásticamente. Estas ondas acústicas pueden ser convertidas en señales eléctricas que dan lugar a la imagen US. La acumulación de MNPs en la zona de interés permite mejorar la calidad de las imágenes, dado que la aplicación de un campo magnético externo provoca un movimiento vibratorio de las MNPs que aumenta la señal recibida^{190,191}. Mediante la elección de las MNPs adecuadas y su combinación con nanomateriales absorbentes en el infrarrojo cercano se pueden lograr potentes sistemas capaces de actuar simultáneamente como agentes de contraste para MRI y US¹⁹². Estas estructuras se han demostrado capaces de detectar células tumorales en condiciones de flujo en ensayos *in vivo*, representando una importante herramienta en la detección de metástasis cancerígena.

En la Figura 1.29 se enumeran varias de las ventajas y desventajas de las técnicas de imagen explicadas en párrafos anteriores aplicadas de forma individual¹⁷⁸.

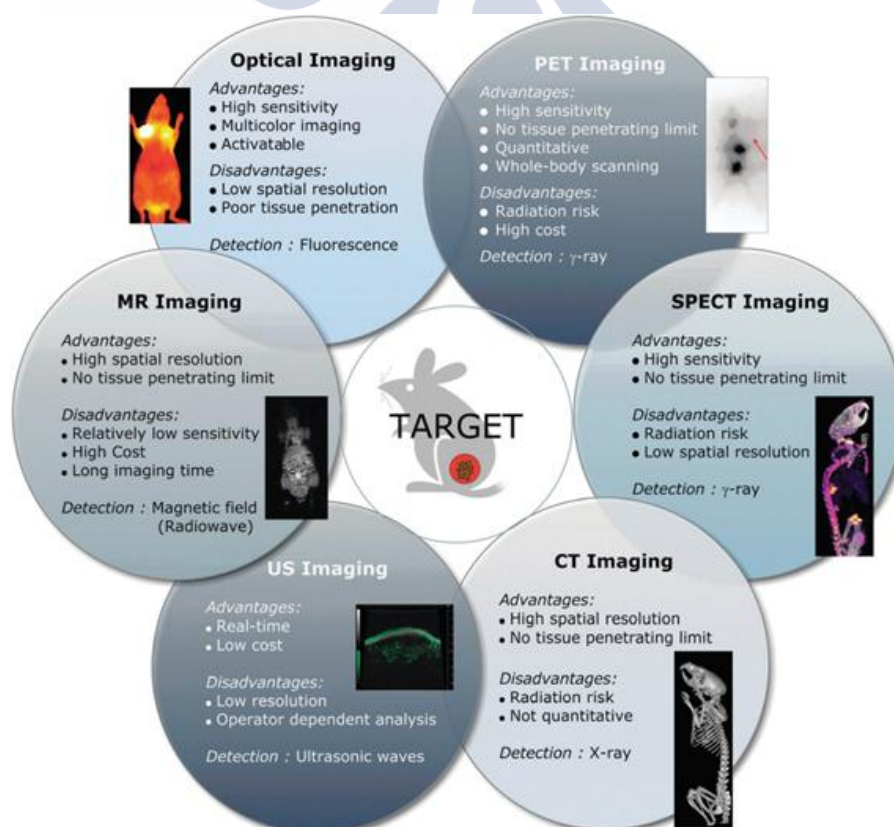


Figura 1.29: Ventajas y desventajas de la aplicación de forma individual de las técnicas de imagen PET, SPECT, CT, US, MR y óptica. Reproducida de la ref. 177. Copyright (2012) con permiso de *Royal Society of Chemistry*.

VI. Otras aplicaciones biomédicas

Un alto porcentaje de las aplicaciones biomédicas de las MNPs estudiadas hasta el día de hoy se pueden incluir en los apartados expuestos previamente. Se trata de cinco áreas de aplicación que engloban gran parte del campo de actuación de la nanomedicina en los últimos años y la práctica totalidad de aquellas donde las MNPs pueden ser implementadas para mejorar el rendimiento de los métodos terapéuticos/diagnósticos utilizados actualmente. Entre las aplicaciones no mencionadas hasta el momento, la más destacada es el uso de las MNPs en el campo de la ingeniería genética. Así, por ejemplo, perlas magnéticas con MNPs en su interior han sido utilizadas para el aislamiento de ARN mensajero (mRNA) mediante su unión selectiva a esta estructura y su posterior separación mediante campos magnéticos^{193,194}. Se trata de un método perfectamente desarrollado ya disponible de forma comercial. Dentro de esta misma área de estudio, las MNPs también han sido empleadas como anclas en el crecimiento secuencial de cadenas genéticas, demostrándose esta como una metodología que permite sintetizar estructuras de esta naturaleza *in vitro* de forma mucho más rápida que las que se implementaban previamente¹⁹⁵.

Por otra parte, las MNPs también han sido empleadas en terapias de sustitución celular. En este tipo de procesos, células que han sido expandidas, seleccionadas y tratadas fuera del organismo (típicamente en cultivos *in vitro*) son administradas para el tratamiento de diversas enfermedades, fundamentalmente de tipo neurodegenerativo. Posteriormente, debido a su importante capacidad de crecimiento y renovación, estas células promueven la reparación del tejido nervioso dañado. En estos experimentos de sustitución o reemplazamiento celular es crucial poder direccionar y seguir el destino de las células trasplantadas, a fin de averiguar su localización final y evaluar los tratamientos efectuados. Para ello, en diversos estudios las células fueron marcadas con MNPs para, de esta forma, poder dirigitas mediante la aplicación de campos magnéticos consiguiendo, además, un agente de contraste de imagen para la posterior evaluación de la zona dañada mediante alguna de las técnicas explicadas en apartados anteriores^{196,197}.

1.3. Copolímeros de bloque. Sistemas de MNPs en película delgada

Los polímeros son estructuras compuestas por diversas combinaciones de unidades repetitivas configuracionales llamadas monómeros, que se disponen en cadenas de diferentes morfologías. Aunque existen polímeros naturales de gran importancia comercial, como por ejemplo el algodón, la seda o la lana, la mayoría de los polímeros usados en nuestra vida diaria son materiales sintéticos con propiedades y aplicaciones de diversa índole¹⁹⁸.

Así, cuando un polímero está constituido por monómeros de un solo tipo se denomina homopolímero, mientras que cuando en su estructura aparecen dos o más tipos diferentes de monómeros hablamos de copolímeros (Figura 1.30).

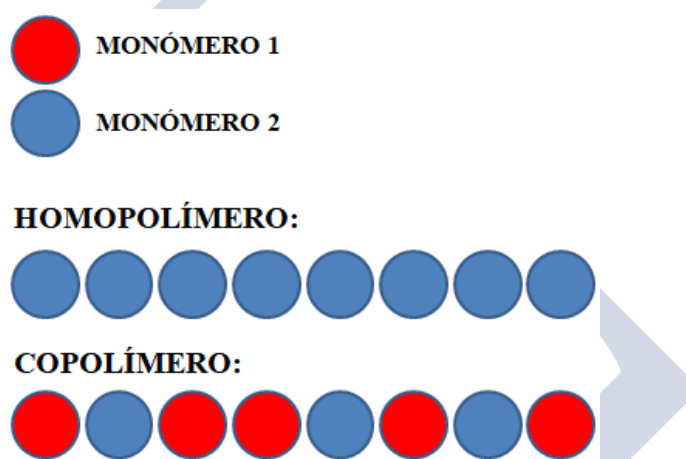


Figura 1.30: Esquema de la estructura de los homopolímeros y los copolímeros.

La gran ventaja de estos últimos reside precisamente en su naturaleza heterogénea, gracias a la cual podemos modificar gran parte de sus propiedades. Los copolímeros varían según su composición química (los diferentes tipos de monómeros que conforman el polímero) y/o por la organización de los citados monómeros en la cadena polimérica. Es decir, podemos variar las propiedades de los copolímeros bien modificando las proporciones de los monómeros en su proceso sintético o bien variando su posición dentro de las cadenas. Los monómeros pueden distribuirse de forma aleatoria o periódica, tal y como se muestra en la Figura 1.31. Si se alternan largas secuencias de un tipo de monómero seguidas por otras secuencias de uno o más monómeros diferentes entonces hablamos de copolímeros de bloque⁵⁹. Estos

copolímeros de bloque se clasifican por el número de bloques constitutivos: si la cadena macromolecular sólo consta de dos bloques, cada uno conformado por un tipo de monómero, entonces el polímero es un copolímero dibloque. Si son tres los bloques constitutivos diferentes tendremos, entonces, un copolímero tribloque, y así sucesivamente.

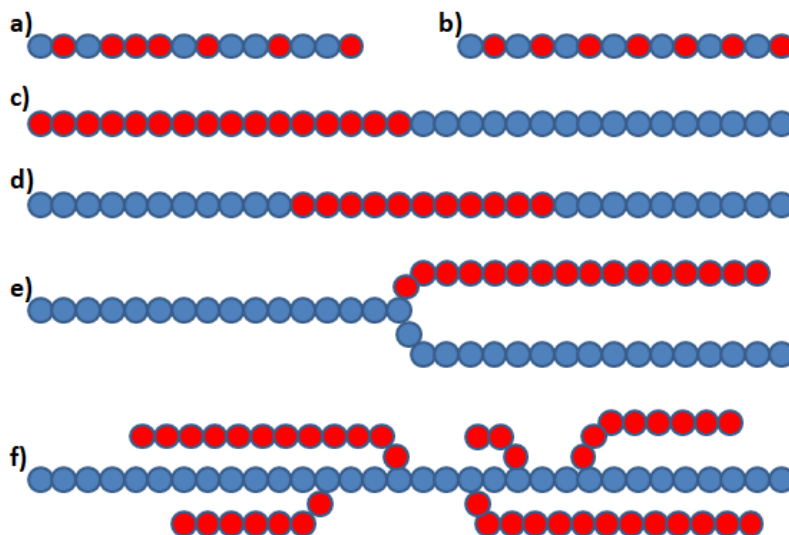


Figura 1.31: Diferentes tipos de copolímeros según la distribución de los monómeros: a) aleatorio, b) alternante, c) dibloque, d) tribloque, e) y f) injertados.

1.3.1. Copolímeros en disolución

Las propiedades de los copolímeros y las diferentes fases en las que se pueden presentar dependen fundamentalmente de su naturaleza química y de su estructura. Así, podemos encontrar polímeros que presentan fase fundida, otros que alcanzan la fase sólida cristalina o polímeros que modifican sus propiedades al constituirse en una mezcla^{199,200}. Existen también algunos sistemas que tienen la capacidad de organizarse formando agregados al encontrarse en un disolvente específico. Este tipo de agregados se producen debido al carácter anfifílico de los copolímeros que los constituyen. Recordemos que una estructura anfifílica es aquella que posee dos partes diferenciadas^{201,202}: una parte liófila, que, en disolución presenta una gran atracción por las moléculas de disolvente, y otra parte liófoba, que presenta poca afinidad o incluso rechazo por las moléculas de disolvente. Los disolventes que originan agregados de copolímeros anfifílicos reciben el nombre de disolventes selectivos, por ser buenos disolventes para uno de los bloques y malos para el otro, mientras que las estructuras

que típicamente se forman se denominan micelas, en analogía con los agregados de los surfactantes convencionales^{203,204}. Por razones energéticas, la estructura que más comúnmente adoptan los copolímeros de bloque al agregarse es la micela de simetría esférica, compuesta por un núcleo formado por los bloques liófilos y una corona formada por los bloques solubles en el disolvente selectivo, si bien estas micelas pueden adoptar otras morfologías, o incluso formarse otras estructuras diferentes como, por ejemplo, vesículas (Figura 1.32).

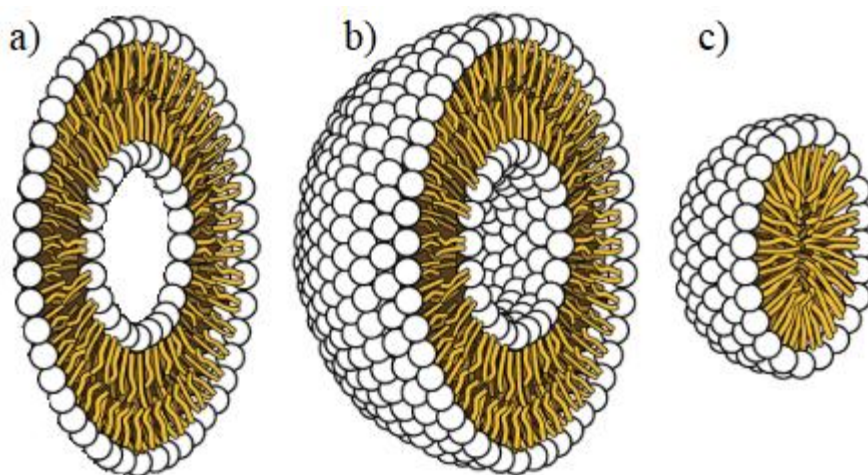


Figura 1.32: Representación esquemática de la constitución de a) y b) vesículas, y c) micelas al disolver copolímeros anfifílicos en disolventes selectivos.

Las características del proceso de micelización son fundamentales para determinar las propiedades y el comportamiento de los copolímeros en disolución. Este comportamiento depende, en general, del grado de concentración del polímero. Así, se pueden diferenciar dos situaciones según la disolución sea diluida o concentrada. En disolución diluida se produce la micelización (en un disolvente selectivo y a una cierta temperatura) por encima de una cierta concentración llamada concentración micelar crítica (cmc). Al incrementar progresivamente la concentración de polímero hasta sobrepasar un valor conocido como concentración de gelificación crítica (cgc), estas micelas pueden ordenarse formando una red, y la disolución experimenta una transición al estado gel²⁰⁵. Estos geles se clasifican en geles duros, caracterizados normalmente por estructurarse en fases cúbicas de micelas esféricas, o geles blandos, donde la ordenación se produce habitualmente en estructura lamelar o en empaquetamiento hexagonal. La

transición entre ambas situaciones viene dada por la fracción de volumen ϕ^* donde las cadenas de polímero empiezan a solaparse:

$$\phi^* = \frac{a^3 N}{R_F^3} = N_p^{1-3\nu} \quad (1.14)$$

dónde N_p es el grado de polimerización, R_F la distancia entre extremos de la cadena, a es la longitud de cada segmento del polímero, y ν es el llamado exponente de Flory, que depende del disolvente). Si $\phi < \phi^*$ el sistema se encuentra en el régimen diluido y si, por el contrario, $\phi > \phi^*$, se obtendrá un incremento en la densidad de empaquetamiento de las cadenas, esto es, se estará en el régimen concentrado.

A una concentración de polímero determinada, la presencia o ausencia de micelas en la disolución depende de la temperatura. La temperatura de micelización crítica es aquella que separa los regímenes diluido y concentrado, es decir, la temperatura a partir de la cual el copolímero se dispone en forma de agregados²⁰⁶.

Obtener un control preciso del tamaño y la morfología de las micelas formadas por los copolímeros anfifílicos en disolución, así como una alta estabilidad termodinámica de las mismas, pasa por la modificación de algunos factores como son el peso molecular del copolímero, la longitud relativa de los bloques liófilo y liófilo, la fracción de volumen de cada bloque, la naturaleza química de la unidad repetitiva de los bloques constitutivos del mismo o la arquitectura de la cadena polimérica. Un mecanismo de control micelar alternativo se basa en la manipulación de las propiedades de la disolución en vez de las del propio polímero, lo que nos permite utilizar un mismo copolímero, o copolímeros de una misma familia, para preparar agregados con diferentes formas y tamaños, atravesando así todo un espectro de morfologías de forma controlada^{207,208}. Entre estas propiedades de la disolución susceptibles de ser modificadas se encuentran, por ejemplo, el contenido de agua en el disolvente mezcla, la naturaleza y composición del disolvente selectivo, la presencia de aditivos (surfactantes, homopolímeros, electrolitos...) o la propia concentración de polímero en la disolución.

1.3.2. Copolímeros en fase sólida y película delgada: uso como nanopatrones

La morfología adoptada por los copolímeros de bloque al ser preparados en forma de película delgada (litografía de copolímeros de bloque) ha sido estudiada ampliamente por numerosos autores, tanto desde un punto de vista teórico como experimental^{200,209,210}. A grandes rasgos, la tendencia de estos copolímeros a separarse en diferentes microdominios está determinada por la magnitud de la interacción repulsiva entre los bloques constituyentes, que a su vez se caracteriza por el producto $\chi \cdot N$, donde χ es el llamado parámetro de interacción de Flory-Huggins^{211,212}, y N es el número de monómeros del copolímero, relacionado de forma directa con su peso molecular. La separación en microdominios tiene lugar cuando este producto excede un valor crítico por encima del cual tiene lugar una transición orden-desorden. Esta transición ocurre típicamente a elevada temperatura (el parámetro de Flory-Huggins guarda una dependencia con la temperatura de la forma $\chi = a + b \cdot T^{-1}$), o bien cuando el peso molecular del copolímero es bajo. Las características de esta separación están establecidas por un delicado balance de energías entre la energía de extensión de las cadenas poliméricas y la energía de interacción en las fronteras de los diferentes microdominios. En los copolímeros dibloque, los microdominios tomarán una u otra morfología dependiendo de la fracción volúmica de cada uno de los bloques que lo conforman. Por su parte, el tamaño de los microdominios, independientemente de su morfología, aumentará con el peso molecular del copolímero^{213,214}. En la Figura 1.33 se muestran, a modo de ejemplo, los diagramas de fases teórico y experimental del copolímero dibloque poliestireno-*block*-polisopreno (PS-*b*-PI)²¹⁵. En dichos diagramas se observa que, como se comentó previamente, es necesario que el producto $\chi \cdot N$ sea superior a un determinado valor umbral para que el copolímero pueda constituirse en microdominios al ser preparado en forma de película delgada. Asimismo, también puede comprobarse como varía la morfología de los citados microdominios poliméricos al modificar la fracción de volumen de los dos bloques constituyentes del copolímero estudiado.

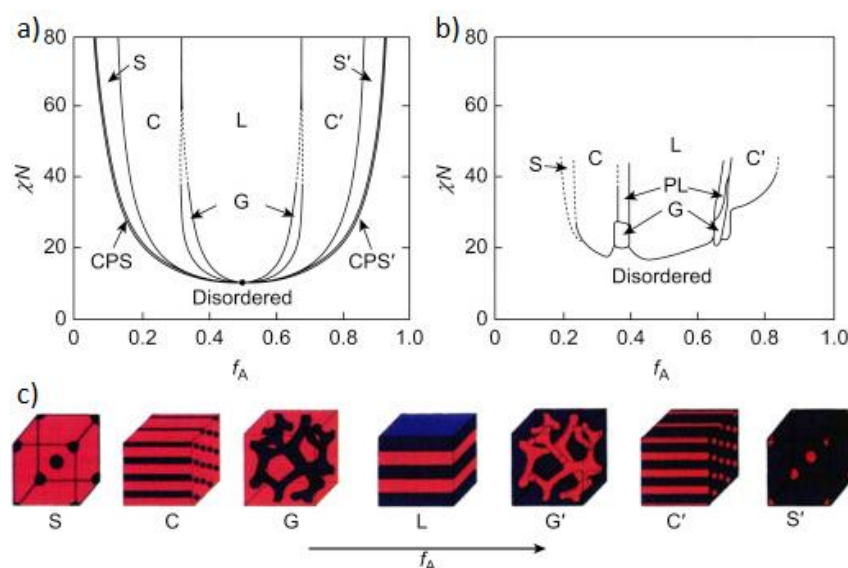


Figura 1.33: Diagramas de fases a) experimental y b) teórico del copolímero de bloque PS-*b*-PI. c) Evolución de la conformación que adoptan los microdominios formados al variar la fracción entre bloques. Reproducidas de la ref. 214. Copyright (2010) con permiso de *American Chemical Society*.

Por otro lado, existe una estrecha relación entre la ciencia de polímeros y la mucho más reciente producción de nanomateriales. El uso de copolímeros para la formación de micelas²¹⁶, vesículas poliméricas²¹⁷, materiales mesoporosos²¹⁸, la reducción y síntesis de NPs^{219,220} o para la formación de películas delgadas como plantillas para obtener nanoestructuras ordenadas^{221,222} ofrece un amplio campo de posibilidades y aplicaciones. Particularmente interesante es el uso de copolímeros de bloque como patrones para la formación de sistemas ordenados de NPs, dada su capacidad de autoensamblaje al ser preparados en forma de película delgada y, de este modo, poder aprovechar las interesantes propiedades de este tipo de sistemas ya explicadas con anterioridad.

Las llamadas técnicas de autoensamblaje resultan atractivas ya que la organización espontánea de bloques a nivel nanoscópico permite la producción paralela a gran escala de nanoestructuras periódicas a bajo coste. A este respecto, los copolímeros de bloque pueden ser una buena alternativa ya que tienden a formar morfologías ordenadas y periódicas (incluyendo esferas, cilindros y lamelas) al ser preparados en forma de películas delgadas, con dimensiones típicas de 5-50 nm para los mencionados microdominios. El tamaño y la forma de los microdominios y, por lo

tanto, del sistema nanométrico formado usando los copolímeros de bloque como soportes pueden ser controlados mediante la manipulación de las longitudes de las cadenas poliméricas, la fracción de volumen de cada bloque, la temperatura o la composición de la atmósfera que lo rodea, como ya mencionamos en apartados anteriores. Su orientación y orden lateral se puede mejorar mediante diferentes métodos, como pueden ser grafo-epitaxia, patrones químicos, campos eléctricos y de cizalla, o el control de la temperatura y la atmósfera en las que se forman las plantillas poliméricas²¹⁵. El ensamblaje de los copolímeros de bloque permite la formación de nanopatrones a gran escala con un fino ajuste de la forma, densidad y dimensiones características^{223,224,225}. De esta forma, debido a la simplicidad y a los bajos costes de fabricación, este tipo de polímeros presentan gran interés para ser usados como plantillas o soportes en la fabricación de materiales nanoestructurados para aplicaciones electrónicas y ópticas. En la Figura 1.34 se muestran, a modo de ejemplo, algunas de las morfologías que pueden adoptar los copolímeros de bloque al ser preparados en forma de película delgada.

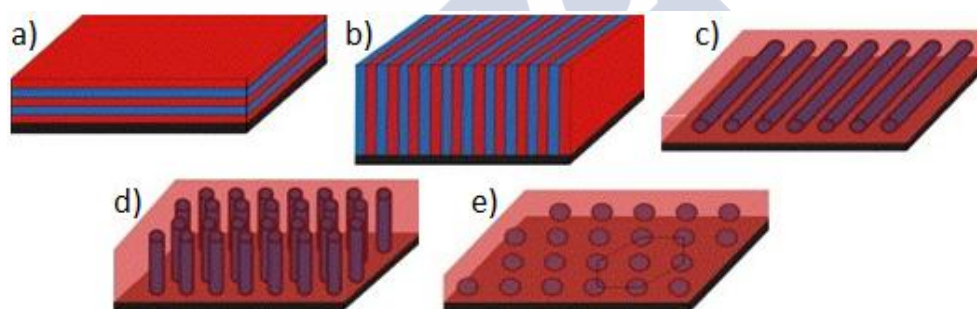


Figura 1.34: Diferentes conformaciones que pueden adoptar los copolímeros de bloque al ser dispuestos en forma de película delgada: microdominios lamelares a) paralelos y b) perpendiculares a la superficie del sustrato, microdominios cilíndricos c) paralelos y d) perpendiculares a la superficie del sustrato, y e) microdominios esféricos. Reproducidas de la ref. 213. Copyright (2005) con permiso de *Elsevier*.

1.3.3. Sistemas híbridos en película delgada: copolímeros de bloque y NPs

Ya se ha comentado en apartados previos que un control preciso sobre la densidad y el ordenamiento de los sistemas de MNPs es muy importante de cara al manejo de las propiedades magnéticas colectivas de los mismos y sus potenciales aplicaciones^{58,215,226,227}. La interacción entre dipolos magnéticos en la escala

nanométrica deja de ser despreciable frente a la energía de anisotropía y pasa a guardar una dependencia muy fuerte con la distancia entre las partículas, de ahí la necesidad de obtener sistemas con un grado de orden elevado. Debido a ello, la preparación de sistemas híbridos a partir del uso de copolímeros de bloque y NPs presenta un gran interés, ya que estas últimas mantienen todas sus propiedades y características y, además, adquieren el ordenamiento característico de los copolímeros de bloque cuando estos son preparados en forma de película delgada.

Las formas de obtener patrones ordenados de NPs usando copolímeros de bloque mediante la preparación de películas delgadas se pueden aglutinar en dos grandes grupos: *in situ* y *ex situ*. En la metodología *ex situ* las NPs son presintetizadas para, posteriormente, depositarlas sobre los copolímeros de bloque, ya estructurados en forma de películas delgadas, que sirven de “patrones-soporte” para las mismas²²⁸. Los sistemas de NPs se funcionalizan de forma que se unan selectivamente a uno de los bloques del copolímero. Las posiciones de las NPs pueden ser controladas mediante el ajuste de su tamaño, de las dimensiones de los microdominios del copolímero, o mediante otros factores como su funcionalidad química o la modificación de las interacciones entre polímero y NPs a través de, por ejemplo, la adición de especies orgánicas que actúen como aditivos. La interacción entre polímero y NPs en los nanocompuestos híbridos formados *ex situ* es debida típicamente a fuerzas de interacción débiles, tales como fuerzas estéricas, fuerzas de Van de Waals o interacciones de ácido-base de Lewis, y presentan la ventaja de permitir la utilización de una mayor variedad de NPs. Por su parte, en la metodología *in situ* las NPs se sintetizan en el interior de los bloques del copolímero²²⁹. Esta metodología implica la carga selectiva de uno (o más) de los bloques del copolímero con el precursor metálico en cuestión seguido de un tratamiento mediante plasma de oxígeno o de inmersión en un medio reductor para formar las NPs deseadas. Los métodos *in situ* sí pueden crear enlaces químicos más fuertes entre las NPs y el polímero, lo que da lugar nanomateriales híbridos más estables y de mayor calidad. Este método de procesamiento es lo que comúnmente se conoce como litografía simple de copolímeros de bloque.

Un ejemplo de metodología *ex situ* es, por ejemplo, el trabajo realizado por Lee *et al.*²³⁰, quienes prepararon sustratos de NPs de oro ordenadas para aplicaciones en detección mediante espectroscopía Raman. Usando el copolímero dibloque poliestireno-*block*-poli-4-vinilpiridina (PS-*b*-P4VP) estos autores obtuvieron películas delgadas en

las que el bloque P4VP se disponía en microdominios cilíndricos perpendiculares a la superficie dentro de una matriz de PS, para posteriormente sumergir esta película delgada durante varias horas en una disolución de NPs de oro que se unían selectivamente a los dominios de P4VP. Finalmente, el copolímero era eliminado dando lugar a un patrón ordenado de NPs de oro, que inicialmente se encontraban en disolución, gracias a las propiedades de autoensamblaje de los copolímeros de bloque. Por su parte, Shin *et al.*²²⁵ obtuvieron mediante la metodología *in situ* patrones ordenados de MNPs de óxido de hierro (Figura 1.35). Así, partiendo también de una película delgada con microdominios de P4VP perpendiculares a la superficie, en este estudio se depositó sobre la misma una sal de hierro que se unió a los bloques de P4VP por interacción electrostática. La posterior reducción del precursor y la eliminación del patrón polimérico dieron lugar a la formación del sistema ordenado de MNPs de óxido de hierro.

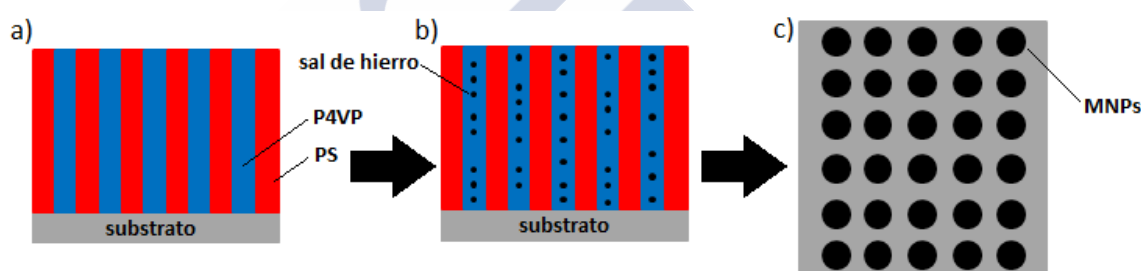


Figura 1.35: Esquema de la síntesis de MNPs mediante litografía de copolímeros de bloque: copolímero en película delgada a) sin modificar; y b) con sal de hierro unida a uno de los bloques. c) Sistema ordenado de MNPs tras reducir la sal de hierro y eliminar el polímero.

Dentro de las técnicas *in situ* resulta particularmente interesante el llamado enfoque supramolecular (SMA, siglas en inglés de “supra-molecular assembly”), en el que los compuestos precursores de las NPs a sintetizar se hacen reaccionar con los copolímeros de bloque en disolución antes de su preparación en forma de película delgada²³¹. De esta forma se logran copolímeros de bloque supramoleculares, en los que uno o varios de los bloques están modificados con moléculas que darán lugar a los complejos de la naturaleza deseada. Mediante este método se logra que, tras la preparación de las películas delgadas, los sistemas de NPs sigan de forma más fiel la ordenación de los patrones poliméricos, así como que presenten un muy alto grado de monodispersidad en cuanto a formas y tamaños de las partículas resultantes. Por ejemplo, Kuila *et al.*²³² usaron el método SMA para sintetizar patrones ordenados de

MNPs de maghemita. Así, modificaron el copolímero de bloque PS-*b*-P4VP con ácido ferroceneacético (FAA), un compuesto organometálico precursor del óxido de hierro, que se unió selectivamente a los bloques de P4VP. A continuación, prepararon películas delgadas bajo las condiciones adecuadas para que los bloques de P4VP modificados con FAA se dispusiesen en forma de dominios cilíndricos perpendiculares a la superficie espaciados periódicamente, de modo que la posterior reducción del precursor magnético y la eliminación de la matriz polimérica diera lugar al sistema ordenado de MNPs.

La litografía de copolímeros de bloque presenta numerosas aplicaciones, especialmente en el ámbito tecnológico. Así, como se ha mencionado al inicio de este Capítulo, esta técnica se puede usar para la obtención de sistemas ordenados de MNPs que pueden ser implementados como dispositivos de almacenamiento de información⁵⁶. También, como respuesta a la creciente tendencia a la miniaturización de los dispositivos electrónicos, se ha analizado el potencial de la litografía de copolímeros de bloque para la obtención de nanodispositivos, como por ejemplo condensadores²³³ o transistores²³⁴, y para el establecimiento de las conexiones entre los mismos. Otra posible aplicación es la preparación de biosensores de alta sensibilidad, consistentes en sistemas ordenados de MNPs o NPs de metales nobles cuya superficie puede ser modificada con determinadas biomoléculas para ser empleados directamente como, por ejemplo, sensores magnéticos o colorimétricos, estos últimos cambiando de color a medida que diferentes moléculas diana se unen a las NPs²³⁵. Por último, una de las aplicaciones más novedosas de esta técnica de formación de películas híbridas es la síntesis de membranas poliméricas porosas mediante la eliminación selectiva de alguno de los bloques del copolímero. Si se consigue que estas membranas tengan una alta densidad de poros y una distribución de tamaños de los mismos extremadamente uniforme podrían ser empleadas para filtrado y clasificación molecular²³⁶.

1.3.4. Métodos de preparación de películas delgadas

Como se ha comentado previamente, el ordenamiento espacial que adquieren los copolímeros de bloque al ser preparados en forma de película delgada bajo unas condiciones específicas (autoensamblaje) posibilita su utilización como nanopatrones para la obtención de sistemas ordenados de NPs²¹⁵. Son varias las técnicas experimentales que se emplean para la síntesis de estas películas delgadas²³⁷, siendo tres

las más comunes entre todas ellas: espín-coating (recubrimiento por giro), dip-coating (recubrimiento por inmersión) y drop-casting (deposición de gota).

i) **Espín-coating:** Es la técnica más comúnmente utilizada para la creación de películas delgadas. Consiste en depositar un cierto volumen de un sistema en disolución sobre un sustrato al que el dispositivo hace girar a elevada velocidad, de forma que la disolución añadida se expande sobre el sustrato debido a la acción de la fuerza centrífuga. Mientras el sustrato gira, el exceso de material se elimina por los bordes de tal manera que se pueden obtener películas del grosor deseado manipulando el tiempo de giro, la velocidad de revolución y/o la concentración de la disolución (Figura 1.36). Finalmente, el disolvente que permanece sobre el sustrato se evapora formándose la película delgada. Este proceso puede presentar ciertas complicaciones con determinados materiales, debido fundamentalmente a la posible absorción de humedad ambiental, por lo que el controlar estrictamente las condiciones de preparación de la película delgada mediante la generación de atmósfera inerte es altamente recomendable. Las grandes ventajas de este método, aparte de su sencillez y la rápida obtención de las muestras, son su bajo coste y el número limitado de parámetros que tienen que ser controlados²³⁸.

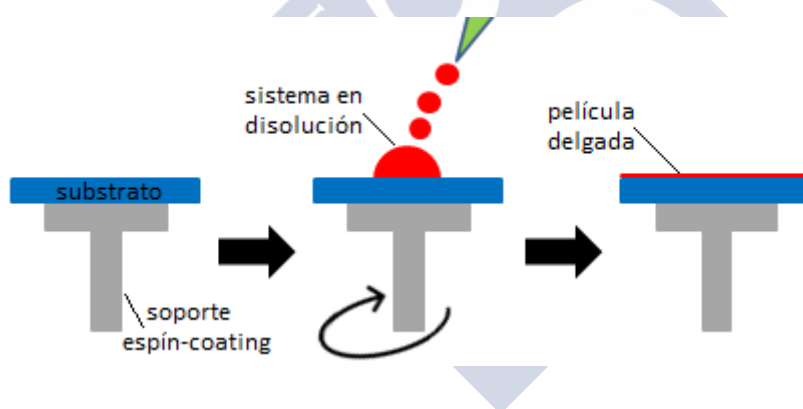


Figura 1.36: Esquema de la preparación de películas delgadas mediante el método de espín-coating.

ii) **Dip-coating:** Al igual que el espín-coating, se trata de una técnica muy utilizada a la hora de sintetizar película delgadas poliméricas. En este caso, el sustrato se introduce lentamente a velocidad constante en el seno de la disolución que contiene el material con el que queremos efectuar el recubrimiento, hasta que este se encuentre totalmente sumergido. Tras permanecer inmerso en el líquido durante un determinado período de tiempo, el sustrato comienza a ser elevado de nuevo a velocidad constante,

siendo esta última magnitud el factor más importante para establecer el espesor de la película delgada que se quiere obtener. Una vez fuera de la disolución se evapora el líquido presente sobre el sustrato formándose la película delgada buscada (Figura 1.37). Este método presenta como inconvenientes la necesidad de utilizar un volumen de disolución mucho más grande que el empleado en la técnica de espín-coating, así como el mayor número de parámetros experimentales que deben ser controlados y que influyen en las características de los sistemas obtenidos. Su gran ventaja es que, al contrario que en el espín-coating, se pueden preparar películas delgadas sobre sustratos con morfologías no planas, como por ejemplo cilindros o esferas²³⁹.

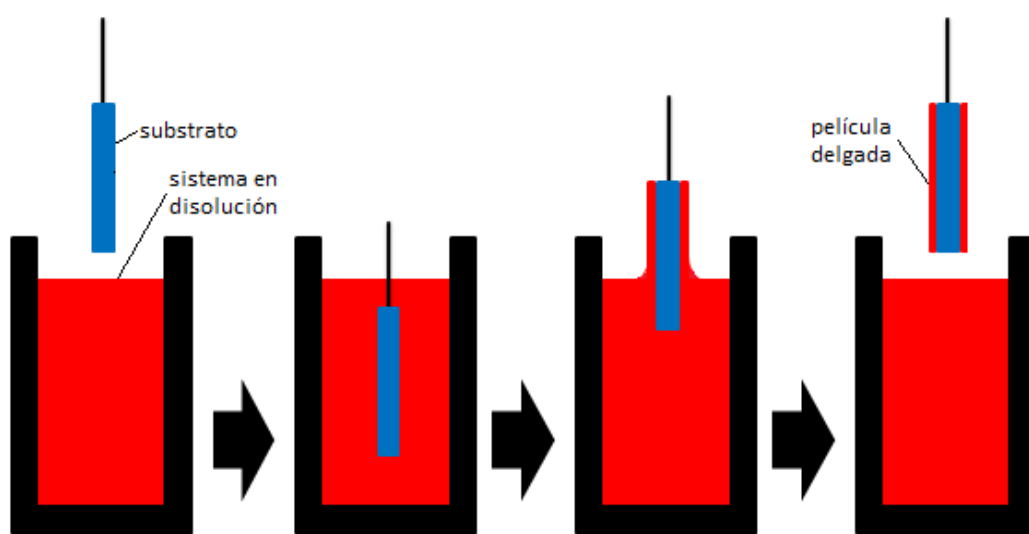


Figura 1.37: Esquema de la preparación de películas delgadas mediante el método de dip-coating.

iii) **Drop-casting:** Es el más simple y menos costoso de los tres mencionados para la preparación de películas delgadas, pero también el que ofrece peores resultados. Consiste, simplemente, en depositar un determinado volumen del material en disolución sobre el sustrato y esperar a que el líquido se evapore y se forme la película delgada. En ocasiones esta evaporación se controla mediante ultrasonidos o ligeras variaciones de temperatura. Esta técnica no permite controlar con precisión el espesor de las películas delgadas resultantes y además, por lo general, da lugar a recubrimientos no uniformes de los sustratos. Es, por ello, el menos recomendado de los tres métodos para estudios de litografía de copolímeros de bloque²⁴⁰.

1.4. Objetivos

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1. **Obtención de MNPs de distintos tamaños, formas y composiciones:** Se buscará desarrollar procesos sintéticos mediante descomposición térmica que permitan un control preciso sobre las características de los nanosistemas magnéticos obtenidos. Una parte importante del estudio a efectuar se focalizará en la obtención de MNPs de óxidos de hierro con morfología cúbica, dada la mayor potencia magnética que, *a priori*, estas pueden desarrollar. Se sintetizarán MNPs con otras formas, fundamentalmente esférica, para llevar a cabo un análisis de la influencia de esta característica sobre las propiedades de los sistemas. Además, se llevará a cabo un estudio exhaustivo del grado de inclusión en la estructura de las MNPs de distintos elementos dopantes como manganeso, cobalto o zinc en diferentes proporciones y combinaciones (dopajes simples, dobles y triples). También se sintetizarán MNPs con una estructura dual núcleo-coraza a través del crecimiento de recubrimientos de material magnético alrededor de las MNPs de composición homogénea previamente sintetizadas. Se buscará que los diferentes sistemas magnéticos nanoestructurados obtenidos presenten tamaños tanto por encima como por debajo del tamaño crítico de transición al régimen superparamagnético, a fin de comprobar el efecto de su comportamiento magnético sobre sus propiedades.
2. **Evaluación de las propiedades físicas de las MNPs obtenidas:** Se llevará a cabo una completa caracterización de los nanosistemas obtenidos, prestando especial atención al estudio de sus propiedades magnéticas. Se evaluará la influencia del tamaño, morfología, grado y tipo de dopaje de las MNPs sobre su estructura cristalina analizando también la influencia del recubrimiento de su superficie libre en su estabilidad coloidal. Mediante medidas de magnetometría se buscará determinar cómo varían las propiedades magnéticas de los diferentes sistemas nanoestructurados, focalizando el estudio en el análisis de las diferencias entre los regímenes magnéticos de las MNPs (ferri- o superparamagnético) y el papel que juegan los distintos grados de dopaje implementados en las mismas.

- 3. Evaluación del potencial de las MNPs como agentes de contraste para MRI, agentes magnetotérmicos y materiales adsorbentes:** Se buscará lograr la transferencia a medio acuoso de las diferentes MNPs previamente preparadas mediante la síntesis por descomposición térmica, y cuyas superficies estarán recubiertas por agentes estabilizantes altamente hidrófobos. Para ello, se ensayarán diferentes protocolos de funcionalización alternativos, tales como recubrimientos poliméricos o procesos de intercambio de ligando, con el objetivo de determinar el más eficiente. Tras su transferencia a medio acuoso, se analizará el correcto recubrimiento y el grado de agregación de las diferentes MNPs, así como su estabilidad en varios fluidos biológicos de distinta complejidad. A continuación, se evaluará la potencial capacidad de los nanosistemas como agentes de contraste para MRI y de hipertermia magnética mediante la determinación de sus coeficientes de relajación transversales y de sus tasas de adsorción específica, respectivamente, así como su potencial utilidad como agentes adsorbentes para la eliminación de metales pesados en medios acuosos. Nuevamente, los estudios se centrarán en intentar establecer la influencia de los tamaños y los grados de dopaje sobre los potenciales usos en las citadas aplicaciones.
- 4. Evaluación *in vitro* del comportamiento y propiedades de las MNPs en medios biológicos:** Aquellas MNPs que muestren mejores capacidades como agentes magnetotérmicos y de contraste para MRI serán analizados para conocer su comportamiento en medios biológicos (cultivos celulares). Se intentarán determinar las concentraciones críticas tóxicas de los distintos nanosistemas en varias líneas celulares y tras diferentes tiempos de incubación, así como el grado de internalización de las MNPs en las entidades celulares. Asimismo, se buscará establecer, por último, las hipotéticas variaciones de las propiedades magnéticas de las nanoestructuras estudiadas tras ser internalizadas dentro de las células.
- 5. Obtención de materiales nanoestructurados magnéticos mediante la técnica de litografía de copolímeros de bloque:** En una línea de trabajo ligeramente diferente, se buscarán obtener nanosistemas ordenados de MNPs de óxido de hierro en la forma de película delgada mediante la técnica de litografía de copolímeros de bloque. El estudio se centrará en la optimización del proceso

sintético, intentando lograr un control preciso sobre las características de las películas delgadas, fundamentalmente en lo que a la densidad superficial y monodispersidad de las MNPs se refiere. Para tal fin se variarán distintos parámetros del proceso sintético, incluyendo la técnica de preparación de las películas delgadas y el post-procesado de las mismas.

6. **Análisis estructural de los sistemas de MNPs en película delgada:** Se buscará determinar la composición, estructura cristalina y propiedades de los sistemas nanoestructurados de MNPs sintetizados bajo las diferentes condiciones que se considerarán. Finalmente, también se intentará establecer la influencia de la técnica de preparación de las películas delgadas sobre el espesor y uniformidad de las mismas.

1.5. Bibliografía

1. Jiles, D. *Introduction to Magnetism and Magnetic Material*. (Chapman and Hall/CRC, 1991).
2. Sirdeshmukh, D. B., Sirdeshmukh, L., Subhadra, K. G. & Sunandana, C. S. Magnetic Resonance. *Nature* **166**, 361–412 (2014).
3. Essen, H. & Fiolhais, M. C. N. Meissner effect, diamagnetism, and classical physics - a review. *Am. J. Phys.* **80**, 164–169 (2011).
4. Morrish, A. H. *The Physical Principles of Magnetism*. Wiley-IEEE Press (IEEE Press, 1965). doi:10.1002/9780470546581
5. Chen, C. W. *Metallurgy of Soft Magnetic Materials*. *Magnetism and Metallurgy of Soft Magnetic Materials* (North-Holland Pub. Co., 1977). doi:10.1016/B978-0-7204-0706-8.50012-5
6. Ayuela, A., Klein, D. J. & March, N. H. Néel Temperature of Antiferromagnets for Phase Transitions Driven by Spin-wave Interactions. *Croat. Chem. Acta* **86**, 463–467 (2013).
7. Kizowski, C., Budzik, S. & Cebulski, J. Finding the Curie Temperature for Ferromagnetic Materials. *Phys. Teach.* **45**, 31 (2007).
8. Aharoni, A. & Arrott, A. Introduction to the Theory of Ferromagnetism. *Physics Today*

- 50**, (Oxford University Press, 1997).
9. Dunlop, D. J. Magnetite: Behavior near the Single-Domain Threshold. *Science* **176**, 41–3 (1972).
 10. Paul Scherrer Institut (PSI). Research at SwissFEL: Looking into magnetic materials. (2013). Available at: <https://www.psi.ch/media/research-at-swissfel-looking-into-magnetic-materials>.
 11. Leslie-Pelecky, D. L. & Rieke, R. D. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chem. Mater.* **8**, 1770–1783 (1996).
 12. Kötz, R., Weitschies, W., Trahms, L. & Semmler, W. Investigation of Brownian and Néel relaxation in magnetic fluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **201**, 102–104 (1999).
 13. Serantes, D. & Baldomir, D. Superparamagnetism and Monte Carlo simulations. *Open Surf. Sci. J.* **4**, 71 (2012).
 14. McKeehan, L. W. Physical theory of ferromagnetic domains [37]. *Phys. Rev.* **79**, 745 (1950).
 15. Kodama, R. H. & Berkowitz, A. E. Atomic-scale magnetic modeling of oxide nanoparticles. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **59**, 6321–6336 (1999).
 16. Néel, L. Antiferromagnetism and ferrimagnetism. *Proc. Phys. Soc. Sect. A* **65**, 869–885 (1952).
 17. Hansen, M. F. & Mørup, S. Estimation of blocking temperatures from ZFC/FC curves. *J. Magn. Magn. Mater.* **203**, 214–216 (1999).
 18. Alborzi, Z., Hassanzadeh, A. & Golzan, M. M. Superparamagnetic Behavior of the Magnetic Hysteresis Loop. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol* **8**, 93–98 (2012).
 19. Liu, Z. L. *et al.* Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. *J. Mater. Synth. Process.* **10**, 83–87 (2002).
 20. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. & Kim, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 023501 (2015).
 21. Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J. & Couvreur, P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* **112**, 5818–5878 (2012).

22. Cornell, R. M. & Schwertmann, U. *The Iron Oxides*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/3527602097
23. Parkinson, G. S. Iron oxide surfaces. *Surf. Sci. Rep.* **71**, 272–365 (2016).
24. Jang, J. T. *et al.* Critical enhancements of MRI contrast and hyperthermic effects by dopant-controlled magnetic nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 1234–1238 (2009).
25. Lu, A. H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 1222–1244 (2007).
26. Zanella, R. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *MundoNano* **5**, 69–81 (2012).
27. Holban, A. M. *Nanoarchitectonics for smart delivery and drug targeting*. (William Andrew, 2016).
28. Colombo, M. *et al.* Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4306 (2012).
29. Daou, T. J. *et al.* Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles. *Chem. Mater.* **18**, 4399–4404 (2006).
30. Ling, D., Lee, N. & Hyeon, T. Chemical synthesis and assembly of uniformly sized iron oxide nanoparticles for medical applications. *Acc. Chem. Res.* **48**, 1276–1285 (2015).
31. Hühn, J. *et al.* Selected standard protocols for the synthesis, phase transfer, and characterization of inorganic colloidal nanoparticles. *Chem. Mater.* **29**, 399–461 (2017).
32. Wang, J., Zhang, K., Peng, Z. & Chen, Q. Magnetic properties improvement in Fe₃O₄ nanoparticles grown under magnetic fields. *J. Cryst. Growth* **266**, 500–504 (2004).
33. Getzlaff, M. Magnetism in Reduced Dimensions – Single Thin Films. in *Fundamentals of Magnetism* 223–238 (Springer Berlin Heidelberg, 2008). doi:10.1007/978-3-540-31152-2_14
34. Salazar-Alvarez, G. *et al.* Cubic versus spherical magnetic nanoparticles: The role of surface anisotropy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13234–13239 (2008).
35. Guardia, P., Labarta, A. & Batlle, X. Tuning the size, the shape, and the magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **115**, 390–396 (2011).

36. Noh, S. H. *et al.* Nanoscale magnetism control via surface and exchange anisotropy for optimized ferrimagnetic hysteresis. *Nano Lett.* **12**, 3716–3721 (2012).
37. De Montferrand, C. *et al.* Iron oxide nanoparticles with sizes, shapes and compositions resulting in different magnetization signatures as potential labels for multiparametric detection. *Acta Biomater.* **9**, 6150–6157 (2013).
38. Huda, N. SPINELS (Normal or Inverse) - All about Chemistry. (2016). Available at: <http://www.chemohollic.com/2016/07/spinels-normal-or-inverse.html>.
39. Liang, X. *et al.* The valence and site occupancy of substituting metals in magnetite spinel structure $\text{Fe}_{3-x}\text{M}_x\text{O}_4$ ($\text{M} = \text{Cr}, \text{Mn}, \text{Co}$ and Ni) and their influence on thermal stability. *Solid State Sci.* **15**, 115–122 (2013).
40. Szotek, Z. *et al.* Electronic structures of normal and inverse spinel ferrites from first principles. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **74**, 174431 (2006).
41. Zélis, P. M. *et al.* Structural and magnetic study of zinc-doped magnetite nanoparticles and ferrofluids for hyperthermia applications. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **46**, 125006 (2013).
42. Yelenich, O. V., Solopan, S. O., Trachevskii, V. V. & Belous, A. G. Synthesis and properties of AFe_2O_4 ($\text{A} = \text{Mn}, \text{Fe}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Zn}$) nanoparticles produced by deposition from diethylene glycol solution. *Russ. J. Inorg. Chem.* **58**, 901–905 (2013).
43. Larumbe, S. *et al.* Ni Doped Fe_3O_4 Magnetic Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **12**, 2652–2660 (2012).
44. Gabal, M. A., El-Shishtawy, R. M. & Al Angari, Y. M. Structural and magnetic properties of nano-crystalline NiZn ferrites synthesized using egg-white precursor. *J. Magn. Magn. Mater.* **324**, 2258–2264 (2012).
45. Ghosh Chaudhuri, R. & Paria, S. Core/shell nanoparticles: Classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chem. Rev.* **112**, 2373–2433 (2012).
46. Zhang, Q. *et al.* Model Driven Optimization of Magnetic Anisotropy of Exchange-Coupled Core-Shell Ferrite Nanoparticles for Maximal Hysteretic Loss. *Chem. Mater.* **27**, 7380–7387 (2015).
47. Lee, J. H. *et al.* Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 418–422 (2011).
48. Fraga López, F., Martínez Ageitos, J. M. & Blanco Méndez, J. *Nanomateriales ¿realidad*

- o ficción ?* (Universidade de Santiago de Compostela, Facultad de Ciencias de Lugo, 2008).
49. Koskela, P. *et al.* Synthesis of cobalt nanoparticles to enhance magnetic permeability of metal-polymer composites. *Adv. Powder Technol.* **22**, 649–656 (2011).
 50. Singh, K., Ohlan, A., Kotnala, R. K., Bakhshi, A. K. & Dhawan, S. K. Dielectric and magnetic properties of conducting ferromagnetic composite of polyaniline with ??-Fe₂O₃ nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* **112**, 651–658 (2008).
 51. Weinstein, J. S. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 15–35 (2010).
 52. Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M. R. & Santamaría, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* **2**, 22–32 (2007).
 53. Mody, V. V. *et al.* Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Appl. Nanosci.* **4**, 385–392 (2014).
 54. Hola, K., Markova, Z., Zoppellaro, G., Tucek, J. & Zboril, R. Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1162–1176 (2015).
 55. Thiesen, B. & Jordan, A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int. J. Hyperth.* **24**, 467–474 (2008).
 56. Skumryev, V. *et al.* Beating the superparamagnetic limit with exchange bias. *Nature* **423**, 850–853 (2003).
 57. Dimitriadis, V., Kechrakos, D., Chubykalo-Fesenko, O. & Tsiantos, V. Shape-dependent exchange bias effect in magnetic nanoparticles with core-shell morphology. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **92**, 064420 (2015).
 58. Pichon, B. P., Pauly, M., Marie, P., Leuvrey, C. & Begin-Colin, S. Tunable magnetic properties of nanoparticle two-dimensional assemblies addressed by mixed self-assembled monolayers. *Langmuir* **27**, 6235–6243 (2011).
 59. Bates, C. M., Maher, M. J., Janes, D. W., Ellison, C. J. & Willson, C. G. Block copolymer lithography. *Macromolecules* **47**, 2–12 (2014).

60. Park, M., Harrison, C., Chaikin, P. M., Register, R. A. & Adamson, D. H. Block copolymer lithography: Periodic arrays of ~1011 holes in 1 square centimeter. *Science* (80-.). **276**, 1401–1404 (1997).
61. Mohmood, I. *et al.* Nanoscale materials and their use in water contaminants removal-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20**, 1239–1260 (2013).
62. Babaeiveli, K., Khodadoust, A. P. & Bogdan, D. Adsorption and removal of arsenic (V) using crystalline manganese (II,III) oxide: Kinetics, equilibrium, effect of pH and ionic strength. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **49**, 1462–1473 (2014).
63. Wu, Z., Li, W., Webley, P. A. & Zhao, D. General and controllable synthesis of novel mesoporous magnetic iron oxide@carbon encapsulates for efficient arsenic removal. *Adv. Mater.* **24**, 485–491 (2012).
64. Hamayun, M. *et al.* Equilibrium and kinetics studies of arsenate adsorption by FePO₄. *Chemosphere* **99**, 207–215 (2014).
65. Yu, L. *et al.* Arsenite removal from aqueous solutions by γ -Fe₂O₃-TiO₂magnetic nanoparticles through simultaneous photocatalytic oxidation and adsorption. *J. Hazard. Mater.* **246–247**, 10–17 (2013).
66. Jacukowicz-Sobala, I., Ociński, D. & Kociołek-Balawejder, E. Synthesis and Evaluation of a Novel Hybrid Polymer Containing Manganese and Iron Oxides as a Sorbent for As(III) and As(V) Removal. *Ind. Eng. Chem. Res.* **52**, 6453–6461 (2013).
67. Xiong, R., Wang, Y., Zhang, X. & Lu, C. Facile synthesis of magnetic nanocomposites of cellulose@ultrasmall iron oxide nanoparticles for water treatment. *RSC Adv.* **4**, 22632–22641 (2014).
68. Qu, J. Research progress of novel adsorption processes in water purification: A review. *J. Environ. Sci.* **20**, 1–13 (2008).
69. Chalasani, R. & Vasudevan, S. Cyclodextrin functionalized magnetic iron oxide nanocrystals: a host-carrier for magnetic separation of non-polar molecules and arsenic from aqueous media. *J. Mater. Chem.* **22**, 14925 (2012).
70. Luo, X. *et al.* Adsorption of As (III) and As (V) from water using magnetite Fe₃O₄-reduced graphite oxide-MnO₂ nanocomposites. *Chem. Eng. J.* **187**, 45–52 (2012).
71. Feng, L., Cao, M., Ma, X., Zhu, Y. & Hu, C. Superparamagnetic high-surface-area

- Fe₃O₄nanoparticles as adsorbents for arsenic removal. *J. Hazard. Mater.* **217–218**, 439–446 (2012).
72. Zhang, G. S., Qu, J. H., Liu, H. J., Liu, R. P. & Li, G. T. Removal mechanism of As(III) by a novel Fe-Mn binary oxide adsorbent: Oxidation and sorption. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 4613–4619 (2007).
73. Cheng, W. *et al.* Dispersion-precipitation synthesis of nanosized magnetic iron oxide for efficient removal of arsenite in water. *J. Colloid Interface Sci.* **445**, 93–101 (2015).
74. Balcells, L. *et al.* One-Step Route to Iron Oxide Hollow Nanocuboids by Cluster Condensation: Implementation in Water Remediation Technology. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 28599–28606 (2016).
75. Zuluaga, J. M. *Una Mirada Al Estudio Y Las Aplicaciones Tecnológicas Y Biomédicas De La Magnetita a Look At the Study and the Technological and Biomedical.* *Revista EIA* **16**, (Escuela de Ingeniería de Antioquia, 2011).
76. Raj, K., Moskowitz, B. & Casciari, R. Advances in ferrofluid technology. *J. Magn. Magn. Mater.* **149**, 174–180 (1995).
77. Shah, R. C. & Shah, R. B. Derivation of ferrofluid lubrication equation for slider bearings with variable magnetic field and rotations of the carrier liquid as well as magnetic particles. *Meccanica* **53**, 857–869 (2018).
78. Steinmeier, R. *et al.* Approaches To the Application of Magnetic Fluids in Electromechanical Drive Systems. *59th Ilmenau Sci. Colloq.* (2017).
79. Svoboda, J. *Magnetic Techniques for the Treatment of Materials.* (Kluwer Academic Publishers, 2004). doi:10.1007/1-4020-2107-0
80. Kerr, R. a. Geologists Take a Trip to the Red Planet. *Science* (80-.). **282**, 1807–1809 (1998).
81. Hughes, C. Magnetic Art. *Science* (80-.). **305**, 603a–603a (2004).
82. Tiberto, P. *et al.* Magnetic properties of jet-printer inks containing dispersed magnetite nanoparticles. *Eur. Phys. J. B* **86**, 173 (2013).
83. Das, S., Mitra, S., Khurana, S. M. P. & Debnath, N. Nanomaterials for biomedical applications. *Front. Life Sci.* **7**, 90–98 (2013).
84. Chatterjee, K., Sarkar, S., Jagajjanani Rao, K. & Paria, S. Core/shell nanoparticles in

- biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **209**, 8–39 (2014).
85. Pelaz, B. *et al.* Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: Anticipating adverse nano-bio interactions. *Small* **9**, 1573–1584 (2013).
86. Soliman, M. G., Pelaz, B., Parak, W. J. & Del Pino, P. Phase transfer and polymer coating methods toward improving the stability of metallic nanoparticles for biological applications. *Chem. Mater.* **27**, 990–997 (2015).
87. Pellegrino, T. *et al.* Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: A general route to water soluble nanocrystals. *Nano Lett.* **4**, 703–707 (2004).
88. Hühn, D. *et al.* Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: Focusing on the sign of the net charge. *ACS Nano* **7**, 3253–3263 (2013).
89. Joris, F. *et al.* The impact of species and cell type on the nanosafety profile of iron oxide nanoparticles in neural cells. *J. Nanobiotechnology* **14**, 69 (2016).
90. Salas, G. *et al.* Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *J. Mater. Chem.* **22**, 21065 (2012).
91. Wang, B., Wei, Q. & Qu, S. Synthesis and characterization of uniform and crystalline magnetite nanoparticles via oxidation-precipitation and modified co-precipitation methods. *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 3786–3793 (2013).
92. Shi, C. *et al.* Inhibition of the cancer-associated TASK 3 channels by magnetically induced thermal release of Tetrandrine from a polymeric drug carrier. *J. Control. Release* **237**, 50–60 (2016).
93. Valdepérez, D., del Pino, P., Sánchez, L., Parak, W. J. & Pelaz, B. Highly active antibody-modified magnetic polyelectrolyte capsules. *J. Colloid Interface Sci.* **474**, 1–8 (2016).
94. Polo, E., Collado, M., Pelaz, B. & Del Pino, P. Advances toward More Efficient Targeted Delivery of Nanoparticles in Vivo: Understanding Interactions between Nanoparticles and Cells. *ACS Nano* **11**, 2397–2402 (2017).
95. Pelaz, B. *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* **11**, 2313–2381 (2017).
96. Lo Giudice, M. C., Herda, L. M., Polo, E. & Dawson, K. A. In situ characterization of nanoparticle biomolecular interactions in complex biological media by flow cytometry.

- Nat. Commun.* **7**, 13475 (2016).
97. Feliu, N. *et al.* Nanoparticle dosage-a nontrivial task of utmost importance for quantitative nanosafety research. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **8**, 479–492 (2016).
 98. Rivera-Gil, P. *et al.* The challenge to relate the physicochemical properties of colloidal nanoparticles to their cytotoxicity. *Acc. Chem. Res.* **46**, 743–749 (2013).
 99. Kreyling, W. G. *et al.* In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 619–623 (2015).
 100. Deatsch, A. E. & Evans, B. A. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **354**, 163–172 (2014).
 101. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939 (2015).
 102. Mazuel, F. *et al.* Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano* **10**, 7627–7638 (2016).
 103. Chiarelli, P. A. *et al.* Nanoparticle Biokinetics in Mice and Nonhuman Primates. *ACS Nano* **11**, 9514–9524 (2017).
 104. Schmelcher, P. Molecule formation in ultrahigh magnetic fields. *Science* (80-.). **337**, 302–303 (2012).
 105. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 16014 (2016).
 106. Anchordoquy, T. J. *et al.* Mechanisms and Barriers in Cancer Nanomedicine: Addressing Challenges, Looking for Solutions. *ACS Nano* **11**, 12–18 (2017).
 107. Stevenson, S. & Morrison-Low, A. D. Scottish photography : a bibliography, 1839-1989. *Zeitschrift fur Naturforschung. Sect. C, Biosci.* **31**, 732–6 (1990).
 108. Widder, K. J., Senyei, A. E. & Scarpelli, D. G. Magnetic Microspheres: A Model System for Site Specific Drug Delivery in Vivo. *Exp. Biol. Med.* **158**, 141–146 (1978).
 109. Nawara, K. *et al.* Adsorption of doxorubicin onto citrate-stabilized magnetic nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **116**, 5598–5609 (2012).

110. Chen, F.-H., Zhang, L.-M., Chen, Q.-T., Zhang, Y. & Zhang, Z.-J. Synthesis of a novel magnetic drug delivery system composed of doxorubicin-conjugated Fe₃O₄ nanoparticle cores and a PEG-functionalized porous silica shell. *Chem. Commun.* **46**, 8633 (2010).
111. Wagstaff, A. J. *et al.* Cisplatin drug delivery using gold-coated iron oxide nanoparticles for enhanced tumour targeting with external magnetic fields. *Inorganica Chim. Acta* **393**, 328–333 (2012).
112. Yao, X. *et al.* Graphene Quantum Dots-Capped Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles as a Multifunctional Platform for Controlled Drug Delivery, Magnetic Hyperthermia, and Photothermal Therapy. *Small* **13**, 1602225 (2017).
113. Yellen, B. B. *et al.* Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 647–654 (2005).
114. Coucke, P. *et al.* *International journal of oncology. International Journal of Oncology* **5**, (University of Crete, Faculty of Medicine, Laboratory of Clinical Virology, 1994).
115. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J. & Corrie, S. R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **33**, 2373–2387 (2016).
116. Daldrup-Link, H. E. *et al.* MRI of tumor-associated macrophages with clinically applicable iron oxide nanoparticles. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5695–5704 (2011).
117. Sindrilaru, A. *et al.* An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 985–997 (2011).
118. Laurentt, N., Sapet, C., Le Gourrierec, L., Bertosio, E. & Zelphati, O. Nucleic acid delivery using magnetic nanoparticles: the Magnetofection technology. *Ther. Deliv* **2**, 471–482 (2011).
119. Plank, C. Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery with lipid-DNA vectors by magnetic force. *J. Liposome Res.* **13**, 105–106 (2003).
120. Plank, C., Zelphati, O. & Mykhaylyk, O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-Progress and prospects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 1300–1331 (2011).
121. Del Pino, P. *et al.* Gene silencing mediated by magnetic lipospheres tagged with small interfering RNA. *Nano Lett.* **10**, 3914–3921 (2010).

122. Smith, C. A. M. *et al.* The effect of static magnetic fields and tat peptides on cellular and nuclear uptake of magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **31**, 4392–4400 (2010).
123. Child, H. W. *et al.* Working together: the combined application of a magnetic field and penetratin for the delivery of magnetic nanoparticles to cells in 3D. *ACS Nano* **5**, 7910–7919 (2011).
124. Lee, N. *et al.* Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponse Therapy. *Chem. Rev.* **115**, 10637–10689 (2015).
125. Soto-Sánchez, C. *et al.* Enduring high-efficiency in vivo transfection of neurons with non-viral magnetoparticles in the rat visual cortex for optogenetic applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **11**, 835–843 (2015).
126. Beik, J. *et al.* Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *J. Control. Release* **235**, 205–221 (2016).
127. Wust, P. *et al.* Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* **3**, 487–497 (2002).
128. Cavaliere, R. *et al.* Selective heat sensitivity of cancer cells. Biochemical and clinical studies. *Cancer* **20**, 1351–1381 (1967).
129. Silva, A. C. *et al.* Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 591–603 (2011).
130. Lepock, J. R. Cellular effects of hyperthermia: Relevance to the minimum dose for thermal damage. *Int. J. Hyperth.* **19**, 252–266 (2003).
131. Huilgol, N., Gupta, S. & Sridhar, C. Hyperthermia with radiation in the treatment of locally advanced head and neck cancer: A report of randomized trial. *J. Cancer Res. Ther.* **6**, 492 (2010).
132. Jordan, A. *et al.* The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J. Neurooncol.* **78**, 7–14 (2006).
133. Pearce, J., Giustini, A., Stigliano, R. & Jack Hoopes, P. Magnetic Heating of Nanoparticles: The Importance of Particle Clustering to Achieve Therapeutic Temperatures. *J. Nanotechnol. Eng. Med.* **4**, 011005 (2013).
134. Phong, P. T., Nguyen, L. H., Manh, D. H., Lee, I. J. & Phuc, N. X. Computer Simulations of Contributions of Néel and Brown Relaxation to Specific Loss Power of

- Magnetic Fluids in Hyperthermia. *J. Electron. Mater.* **46**, 2393–2405 (2017).
135. Deissler, R. J., Wu, Y. & Martens, M. A. Dependence of Brownian and Néel relaxation times on magnetic field strength. *Med. Phys.* **41**, 012301 (2014).
136. Martinez-Boubeta, C. *et al.* Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications. *Sci. Rep.* **3**, 1652 (2013).
137. Kita, E. *et al.* Ferromagnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia and thermoablation therapy. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **43**, 474011 (2010).
138. Gas, P. & Miaskowski, A. Specifying the ferrofluid parameters important from the viewpoint of magnetic fluid hyperthermia. in *2015 Selected Problems of Electrical Engineering and Electronics, WZEE 2015* 1–6 (IEEE, 2016). doi:10.1109/WZEE.2015.7394040
139. Brezovich, I. A., Atkinson, W. J. & Lilly, M. B. Local hyperthermia with interstitial techniques. *Cancer Res.* **44**, 4752s–4756s (1984).
140. Hergt, R. & Dutz, S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *J. Magn. Magn. Mater.* **311**, 187–192 (2007).
141. Tanimoto, A. & Kuribayashi, S. Application of superparamagnetic iron oxide to imaging of hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Radiol.* **58**, 200–216 (2006).
142. Guardia, P. *et al.* Water-soluble iron oxide nanocubes with high values of specific absorption rate for cancer cell hyperthermia treatment. *ACS Nano* **6**, 3080–3091 (2012).
143. Guardia, P. *et al.* One pot synthesis of monodisperse water soluble iron oxide nanocrystals with high values of the specific absorption rate. *J. Mater. Chem. B* **2**, 4426–4434 (2014).
144. Di Corato, R. *et al.* Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials* **35**, 6400–6411 (2014).
145. Sathya, A. *et al.* CoFe₃-xO₄ Nanocubes for Theranostic Applications: Effect of Cobalt Content and Particle Size. *Chem. Mater.* **28**, 1769–1780 (2016).
146. Casula, M. F. *et al.* Manganese doped-iron oxide nanoparticle clusters and their potential as agents for magnetic resonance imaging and hyperthermia. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 16848–16855 (2016).
147. Périgo, E. A. *et al.* Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Appl. Phys.*

- Rev.* **2**, 041302 (2015).
148. Dias, J. T. *et al.* DNA as a molecular local thermal probe for the analysis of magnetic hyperthermia. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 11526–11529 (2013).
149. Riedinger, A. *et al.* Subnanometer local temperature probing and remotely controlled drug release based on Azo-functionalized iron oxide nanoparticles. *Nano Lett.* **13**, 2399–2406 (2013).
150. Fischer, A. & Sackmann, E. A charge-decoration technique for studying the heterogeneity of coexistent monolayer phases by electron microscopy. *Nature* **313**, 299–301 (1985).
151. Fan, W., Yung, B., Huang, P. & Chen, X. Nanotechnology for Multimodal Synergistic Cancer Therapy. *Chem. Rev.* **117**, 13566–13638 (2017).
152. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* Heat-generating iron oxide nanocubes: Subtle ‘deconstructors’ of the tumoral microenvironment. *ACS Nano* **8**, 4268–4283 (2014).
153. Lee, J.-H. *et al.* On-Demand Drug Release System for InVivo Cancer Treatment through Self-Assembled Magnetic Nanoparticles. *Angew. Chemie-International Ed.* **52**, 4384–4388 (2013).
154. Espinosa, A. *et al.* Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. *ACS Nano* **10**, 2436–2446 (2016).
155. Modo, M. M. J., Bulte, J. W. M. & Kim, E. E. Molecular and Cellular MR Imaging. *J. Nucl. Med.* **48**, 2087–2087 (2007).
156. Lee, N. & Hyeon, T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2575–2589 (2012).
157. Mahmoudi, M. *et al.* Magnetic resonance imaging tracking of stem cells in vivo using iron oxide nanoparticles as a tool for the advancement of clinical regenerative medicine. *Chem. Rev.* **111**, 253–280 (2011).
158. Wang, Y.-X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant Imaging Med Surg* **1**, 35–44 (2011).
159. Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J. & Lauffer, R. B. Gadolinium(III) chelates as

- MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **99**, 2293–2352 (1999).
160. Hingorani, D. V., Bernstein, A. S. & Pagel, M. D. A review of responsive MRI contrast agents: 2005-2014. *Contrast Media Mol. Imaging* **10**, 245–265 (2015).
161. Jin, R., Lin, B., Li, D. & Ai, H. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: Design considerations and clinical applications. *Curr. Opin. Pharmacol.* **18**, 18–27 (2014).
162. Ni, D., Bu, W., Ehlerding, E. B., Cai, W. & Shi, J. Engineering of inorganic nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 7438–7468 (2017).
163. Vuong, Q. L., Gillis, P., Roch, A. & Gossuin, Y. Magnetic resonance relaxation induced by superparamagnetic particles used as contrast agents in magnetic resonance imaging: a theoretical review. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **9**, e1468 (2017).
164. Jun, Y. W., Lee, J. H. & Cheon, J. Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 5122–5135 (2008).
165. Zhao, Z. *et al.* Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T2 contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nat. Commun.* **4**, 2266 (2013).
166. Kang, T. *et al.* Surface design of magnetic nanoparticles for stimuli-responsive cancer imaging and therapy. *Biomaterials* **136**, 98–114 (2017).
167. Javed, Y., Akhtar, K., Anwar, H. & Jamil, Y. MRI based on iron oxide nanoparticles contrast agents: effect of oxidation state and architecture. *J. Nanoparticle Res.* **19**, 366 (2017).
168. Jun, Y. W. *et al.* Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5732–5733 (2005).
169. Kim, B. H. *et al.* Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T1 magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12624–12631 (2011).
170. Ahmad, T. *et al.* Particle size dependence of relaxivity for silica-coated iron oxide

- nanoparticles. *Curr. Appl. Phys.* **12**, 969–974 (2012).
171. Shapiro, E. M. *et al.* MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 10901–10906 (2004).
172. Wunderbaldinger, P., Josephson, L. & Weissleder, R. Crosslinked iron oxides (CLIO): a new platform for the development of targeted MR contrast agents. *Acad Radiol* **9 Suppl 2**, S304-6 (2002).
173. Balasubramaniam, S. *et al.* Toward design of magnetic nanoparticle clusters stabilized by biocompatible diblock copolymers for T₂-weighted MRI contrast. *Langmuir* **30**, 1580–1587 (2014).
174. Ai, H. *et al.* Magnetite-loaded polymeric micelles as ultrasensitive magnetic-resonance probes. *Adv. Mater.* **17**, 1949–1952 (2005).
175. Kievit, F. M. *et al.* Targeting of primary breast cancers and metastases in a transgenic mouse model using rationally designed multifunctional SPIONs. *ACS Nano* **6**, 2591–2601 (2012).
176. Condeelis, J. & Weissleder, R. In vivo imaging in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a003848 (2010).
177. Wang, X. *et al.* Dual-Enzyme-Loaded Multifunctional Hybrid Nanogel System for Pathological Responsive Ultrasound Imaging and T₂ Weighted Magnetic Resonance Imaging. *ACS Nano* **9**, 5646–5656 (2015).
178. Lee, D.-E. *et al.* Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2656–2672 (2012).
179. Oh, M. H. *et al.* Large-scale synthesis of bioinert tantalum oxide nanoparticles for X-ray computed tomography imaging and bimodal image-guided sentinel lymph node mapping. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 5508–5515 (2011).
180. Kim, D. *et al.* Amphiphilic polymer-coated hybrid nanoparticles as CT/MRI dual contrast agents. *Nanotechnology* **22**, 155101 (2011).
181. Zhang, L., Zhou, H., Belzile, O., Thorpe, P. & Zhao, D. Phosphatidylserine-targeted bimodal liposomal nanoparticles for in vivo imaging of breast cancer in mice. *J. Control. Release* **183**, 114–123 (2014).
182. Lee, H. *et al.* Thermally Cross-Linked Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles:

- Synthesis and Application as a Dual Imaging Probe for Cancer in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12739–12745 (2007).
183. Cheng, L. *et al.* Facile preparation of multifunctional upconversion nanoprobe for multimodal imaging and dual-targeted photothermal therapy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 7385–7390 (2011).
184. Xia, A. *et al.* Core-shell NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺@Fe₃O₄ nanocrystals for dual-modality T₂-enhanced magnetic resonance and NIR-to-NIR upconversion luminescent imaging of small-animal lymphatic node. *Biomaterials* **32**, 7200–7208 (2011).
185. Chen, F. *et al.* Chelator-free synthesis of a dual-modality PET/MRI agent. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 13319–13323 (2013).
186. Torres Martin de Rosales, R. *et al.* Synthesis of ⁶⁴Cu^{II}-Bis(dithiocarbamatebisphosphonate) and Its Conjugation with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: In Vivo Evaluation as Dual-Modality PET-MRI Agent. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 5509–5513 (2011).
187. Sandiford, L. *et al.* Bisphosphonate-anchored pegylation and radiolabeling of superparamagnetic iron oxide: Long-circulating nanoparticles for in vivo multimodal (T₁ MRI-SPECT) imaging. *ACS Nano* **7**, 500–512 (2013).
188. Goodwill, P. W. *et al.* X-Space MPI: Magnetic nanoparticles for safe medical imaging. *Adv. Mater.* **24**, 3870–3877 (2012).
189. Yu, E. Y. *et al.* Magnetic Particle Imaging: A Novel in Vivo Imaging Platform for Cancer Detection. *Nano Lett.* **17**, 1648–1654 (2017).
190. Qu, M. *et al.* Magneto-photo-acoustic imaging. *Biomed. Opt. Express* **2**, 385 (2011).
191. Luke, G. P., Yeager, D. & Emelianov, S. Y. Biomedical applications of photoacoustic imaging with exogenous contrast agents. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 422–437 (2012).
192. Hu, X. *et al.* Trapping and photoacoustic detection of CTCs at the single cell per milliliter level with magneto-optical coupled nanoparticles. *Small* **9**, 2046–2052 (2013).
193. Levison, P. R. *et al.* Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification. *J. Chromatogr. A* **816**, 107–111 (1998).
194. Shi, X., Chen, C.-H., Gao, W., Chao, S. & Meldrum, D. R. Parallel RNA extraction using magnetic beads and a droplet array. *Lab Chip* **15**, 1059–1065 (2015).

195. Hidalgo-Álvarez, R. *Structure and functional properties of colloidal systems*. **20093872**, (CRC Press, 2010).
196. Hamasaki, T. *et al.* Characterization of labeled neural progenitor cells for magnetic targeting. *Neuroreport* **16**, 1641–1645 (2005).
197. Guzman, R. *et al.* Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 10211–10216 (2007).
198. Meyer, W. H. Polymer physics. by Ulf W. Gedde, Chapman & Hall, London 1995, x, 298 pp., softcover, £69.00, ISBN 0-412-62640-3. *Adv. Mater.* **8**, 863–864 (1996).
199. Fayt, R., Jérôme, R. & Teyssié, P. Interface modification in polymer blends. in *Multiphase Polymers: Blends and Ionomers* **395**, 38–66 (1989).
200. Hamley, I. W. *The Physics of Block Copolymers (Oxford Science Publications)*. (Oxford University Press, 1999).
201. Wennerström, H. & Lindman, B. Micelles. Physical chemistry of surfactant association. *Phys. Rep.* **52**, 1–86 (1979).
202. Mittal, K. L. Micellization, Solubilization, and Microemulsions Volume 2 Plenum Press· New York and London.
203. Dondos, A., Rempp, P. & Benoît, H. Solution behavior of graft copolymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Lett.* **4**, 293–300 (1966).
204. Tuzar, Z. & Kratochvíl, P. Block and graft copolymer micelles in solution. *Adv. Colloid Interface Sci.* **6**, 201–232 (1976).
205. Lubensky, T. C. & Isaacson, J. Field theory for the statistics of branched polymers, gelation, and vulcanization. *Phys. Rev. Lett.* **41**, 829–832 (1978).
206. Linee, P. & Malmsten, M. Temperature-Dependent Micellization in Aqueous Block Copolymer Solutions. *Macromolecules* **25**, 5434–5439 (1992).
207. Shen, H. & Eisenberg, A. Control of architecture in block-copolymer vesicles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **39**, 3310–3312 (2000).
208. Ivanova, R., Lindman, B. & Alexandridis, P. Modification of the lyotropic liquid crystalline microstructure of amphiphilic block copolymers in the presence of cosolvents. *Adv. Colloid Interface Sci.* **89–90**, 351–382 (2001).

209. Bates, F. S. & Fredrickson, G. H. Block copolymers-designer soft materials. *Phys. Today* **52**, 32–38 (1999).
210. Bates, F. S. & Fredrickson, G. H. Block Copolymer Thermodynamics: Theory and Experiment. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **41**, 525–557 (1990).
211. Mark, H. F. & Atlas, S. H. *Principles of polymer stability. Polymer Engineering & Science* **5**, (Cornell University Press, 1965).
212. Allin, S. B. Polymer Science and Technology, 2nd Edition (Joel R. Fried). *J. Chem. Educ.* **81**, 809 (2004).
213. Rebei, A. & De Pablo, J. Theory for phase transitions in diblock copolymers: The lamellar case. *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* **63**, 041802 (2001).
214. Segalman, R. A. Patterning with block copolymer thin films. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **48**, 191–226 (2005).
215. Kim, H. C., Park, S. M., Hinsberg, W. D. & Division, I. R. Block copolymer based nanostructures: Materials, processes, and applications to electronics. *Chem. Rev.* **110**, 146–177 (2010).
216. Gaucher, G. *et al.* Block copolymer micelles: Preparation, characterization and application in drug delivery. *J. Control. Release* **109**, 169–188 (2005).
217. Battaglia, G. & Ryan, A. J. Bilayers and interdigitation in block copolymer vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 8757–8764 (2005).
218. Kipkemboi, P., Fogden, A., Alfredsson, V. & Flodström, K. Triblock copolymers as templates in mesoporous silica formation: Structural dependence on polymer chain length and synthesis temperature. *Langmuir* **17**, 5398–5402 (2001).
219. Xiong, Y. *et al.* Poly (vinyl pyrrolidone): A dual functional reductant and stabilizer for the facile synthesis of noble metal nanoplates in aqueous solutions. *Langmuir* **22**, 8563–8570 (2006).
220. Sakai, T. & Alexandridis, P. Spontaneous formation of gold nanoparticles in poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) solutions: Solvent quality and polymer structure effects. *Langmuir* **21**, 8019–8025 (2005).
221. Seo, M.-S. *et al.* Vertically aligned nanostructured TiO₂ photoelectrodes for high

- efficiency perovskite solar cells via a block copolymer template approach. *Nanoscale* **8**, 11472–11479 (2016).
222. Stefik, M., Guldin, S., Vignolini, S., Wiesner, U. & Steiner, U. Block copolymer self-assembly for nanophotonics. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 5076–5091 (2015).
223. Tseng, Y. T., Tseng, W. H., Lin, C. H. & Ho, R. M. Fabrication of double-length-scale patterns via lithography, block copolymer templating, and electrodeposition. *Adv. Mater.* **19**, 3584–3588 (2007).
224. Sohn, B. H. *et al.* Directed self-assembly of two kinds of nanoparticles utilizing monolayer films of diblock copolymer micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6368–6369 (2003).
225. Shin, D. O. *et al.* Sub-nanometer level size tuning of a monodisperse nanoparticle array via block copolymer lithography. *Adv. Funct. Mater.* **21**, 250–254 (2011).
226. Majetich, S. A., Wen, T. & Booth, R. A. Functional magnetic nanoparticle assemblies: Formation, collective behavior, and future directions. *ACS Nano* **5**, 6081–6084 (2011).
227. Bang, J., Jeong, U., Ryu, D. Y., Russell, T. P. & J Hawker, C. Block copolymer nanolithography: Translation of molecular level control to nanoscale patterns. *Adv. Mater.* **21**, 4769–4792 (2009).
228. Lee, W., Lee, S. Y., Briber, R. M. & Rabin, O. Self-assembled SERS substrates with tunable surface plasmon resonances. *Adv. Funct. Mater.* **21**, 3424–3429 (2011).
229. Jiang, B. *et al.* Phase Behavior of Alkyne-Functionalized Styrenic Block Copolymer/Cobalt Carbonyl Adducts and in Situ Formation of Magnetic Nanoparticles by Thermolysis. *Macromolecules* **49**, 853–865 (2016).
230. Lee, W., Lee, S. Y., Zhang, X., Rabin, O. & Briber, R. M. Hexagonally ordered nanoparticles templated using a block copolymer film through Coulombic interactions. *Nanotechnology* **24**, 045305 (2013).
231. Laforgue, A., Bazuin, C. G. & Prud'homme, R. E. A study of the supramolecular approach in controlling diblock copolymer nanopatterning and nanoporosity on surfaces. *Macromolecules* **39**, 6473–6482 (2006).
232. Kuila, B. K., Rama, M. S. & Stamm, M. Supramolecular assembly of poly(styrene)-b-poly(4-vinylpyridine) and ferroceneacetic acid: An easy way to large-scale controllable periodic arrays of iron oxide nanomaterials. *Adv. Mater.* **23**, 1797–1800 (2011).

233. Black, C. T. *et al.* High-capacity, self-assembled metal-oxide-semiconductor decoupling capacitors. *IEEE Electron Device Lett.* **25**, 622–624 (2004).
234. Black, C. T. Self-aligned self assembly of multi-nanowire silicon field effect transistors. *Appl. Phys. Lett.* **87**, 1–3 (2005).
235. Taton, T. A., Lu, G. & Mirkin, C. A. Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5164–5165 (2001).
236. Leoni, L., Boiarski, A. & Desai, T. A. Characterization of nanoporous membranes for immunoisolation: Diffusion properties and tissue effects. *Biomed. Microdevices* **4**, 131–139 (2002).
237. Grimoldi, A. Deposition and Patterning Techniques for Organic Materials. (2015).
238. University of Louisville. Spin Coating Theory. *Micro/Nano Technol.* 2–3 (2013).
239. Brinker, C. J. Dip coating. *Chem. Solut. Depos. Funct. Oxide Thin Film.* **9783211993**, 233–261 (2013).
240. Farag, A. A. M. & Yahia, I. S. Structural, absorption and optical dispersion characteristics of rhodamine B thin films prepared by drop casting technique. *Opt. Commun.* **283**, 4310–4317 (2010).

2. Nanopartículas magnéticas de forma cúbica

En este Capítulo se abordarán la síntesis y posterior caracterización de MNPs de morfología cúbica con diferentes tamaños y composiciones¹. Se variarán diferentes parámetros del proceso sintético a fin de comprobar su efecto sobre el tamaño de las partículas sintetizadas, y se ensayarán diferentes dopados con cobalto, zinc y manganeso y su consiguiente efecto sobre las características de los nanocubos magnéticos². Posteriormente, se estudiarán de forma detallada las propiedades estructurales y magnéticas de las MNPs cúbicas sintetizadas de cara a evaluar su posible uso en diferentes aplicaciones biomédicas^{3,4}. Como se explicó en la Introducción de la presente Tesis, las MNPs con forma cúbica resultan interesantes dado que presentan una anisotropía de superficie mínima al mantener la simetría de coordinación de la estructura cristalina en la superficie⁵. Esta condición da lugar a que estas MNPs muestren unas propiedades magnéticas mejoradas/aumentadas con respecto a otras de igual tamaño y características pero con diferente morfología^{6,7}. Así, se sintetizarán MNPs basadas en óxido de hierro con tamaños de arista en la mayoría de los casos en el rango de los 30 a los 50 nm, dimensiones ligeramente por encima de las de la transición entre los regímenes ferro- o ferrimagnético y superparamagnético^{8,9}, de modo que los sistemas presentarán, por lo general, áreas no despreciables en sus ciclos de histéresis a temperatura ambiente¹⁰. Al presentar valores no nulos tanto de magnetización remanente como de campo coercitivo, estas partículas tendrán una mayor capacidad de absorber energía proveniente de un campo magnético externo aplicado y, por tanto, un mayor potencial como posibles agentes hipertérmicos¹¹. Sin embargo, la existencia de esta magnetización remanente también provocará la tendencia de estos sistemas a agregarse y constituirse en forma de clústers, lo que puede suponer un cierto inconveniente de cara a su utilización en diversos ámbitos. En este sentido, las partículas con dimensiones en el intervalo antes mencionado resultan particularmente interesantes debido al compromiso existente entre su elevada potencia magnética y su tendencia a la agregación reducida al ser sometidas a campos magnéticos externos¹². Estos fenómenos de agregación intentarán controlarse mediante el recubrimiento superficial de las MNPs con ligandos de diferente naturaleza, principalmente polimérica¹³. Estos mismos recubrimientos posibilitarán, además, la transferencia de los

sistemas nanoestructurados a medio acuoso, condición fundamental de cara a su implementación en aplicaciones biomédicas como la magnetotermia o la imagen por resonancia magnética.

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. Materiales

Los reactivos necesarios para la síntesis de los diferentes sistemas magnéticos fueron: acetilacetatos de hierro (III) (pureza 99%), cobalto (II) (97%), manganeso (II) (99%) y zinc (II) (97%) como compuestos precursores de los elementos metálicos que formarán parte de la estructura de las MNPs, ácido oleico (90%) como agente surfactante encargado de estabilizar y dar forma a las partículas, y éter bencílico (99%) como disolvente de alto punto de ebullición en el que llevar a cabo las reacciones de descomposición térmica. Para efectuar la transferencia a medio acuoso de las MNPs mediante la técnica de recubrimiento polimérico se emplearon poli(isobutileno-anhídrido maleico) (PMA) $M_w=6000$ Da, dodecilamina (98%), tetrahidrofurano (THF) (99.9%) y cloroformo (98%), mientras que para los ensayos de transferencia a medio acuoso mediante la técnica de intercambio de ligando se utilizaron ácido meso-2,3-dimercapsuccínico (DMSA) (98%), dimetilsulfóxido (DMSO) (98%) y tolueno (99.8%). Todos los reactivos anteriores fueron suministrados por *Sigma-Aldrich* y usados sin ninguna clase de purificación.

Para los ensayos de estabilidad en medio biológico se utilizaron medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suero fetal bovino (FBS), L-glutamina, y penicilina/estreptomicina, suministrados por *Invitrogen*, así como cloruro de sodio (99.9%), sulfato de sodio (99%), cloruro de calcio (96%), glicina (98%), fosfato de sodio dibásico (98%) y ftalato de potasio (99%) (componentes del medio fagolisosomal), que fueron comprados a la compañía *Sigma-Aldrich* y usados sin purificación extra. Todos los demás reactivos empleados, tales como etanol, metanol o acetona, de grado analítico, fueron también adquiridos en *Sigma-Aldrich* y usados como se recibieron.

2.1.2. Síntesis

Las síntesis de las MNPs de óxido de hierro de forma cúbica se llevaron a cabo mediante procesos de descomposición térmica¹⁴ en un reactor de 500 ml de volumen de tres bocas conectado a una línea Schlenk estándar y a un condensador de reflujo de agua. Este reactor se colocó sobre una manta calefactora y se conectó a un sistema de agitación mecánica de varilla, tal y como se muestra en la Figura 2.1.

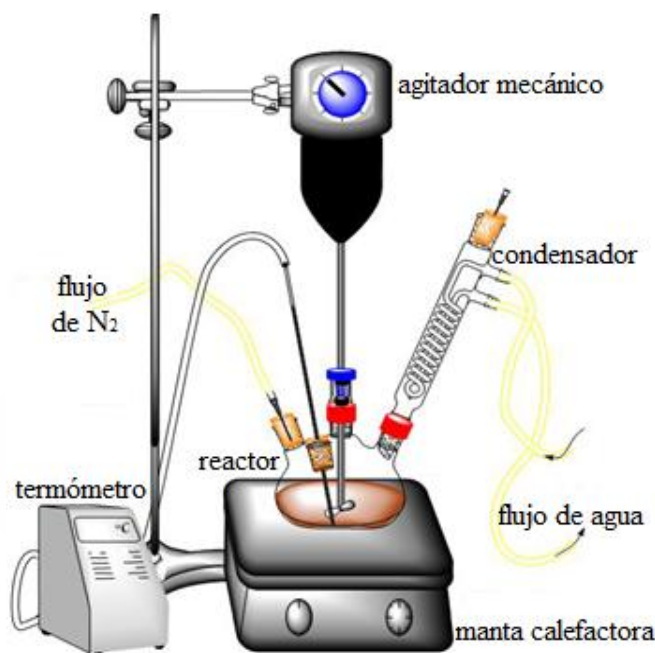


Figura 2.1: Esquema del montaje experimental utilizado para la síntesis de MNPs cúbicas.

Las síntesis se basaron en el protocolo desarrollado por Hyeon *et al.*¹⁵, pero introduciendo en el mismo importantes modificaciones. En una síntesis típica de MNPs cúbicas de óxido de hierro con una longitud de arista de aproximadamente 50 nm, 0.706 g de acetilacetonato de hierro ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) (2 mmol) se mezclan con 1.129 g de ácido oleico (4 mmol) en 10 ml de éter bencílico, obteniéndose una disolución de color marrón oscuro. Después de introducir la disolución en un baño de ultrasonidos durante dos minutos, esta se vierte en el reactor y se inicia la agitación mecánica a una velocidad de 100 rpm. La temperatura del sistema se incrementa a 100 °C y, una vez alcanzada, en primer lugar se aplica un vacío primario de 10 mbar durante 30 min. y, a continuación, este se sustituye por el flujo de nitrógeno a través de la línea Schlenk durante 45 min., a fin de asegurar una buena atmósfera inerte. Posteriormente la

temperatura del sistema se eleva a 290 °C a un ritmo de aumento de 3 °C·min⁻¹ y se mantiene estable en ese valor durante 30 min. (Figura 2.2), tomando la disolución un color negro intenso.

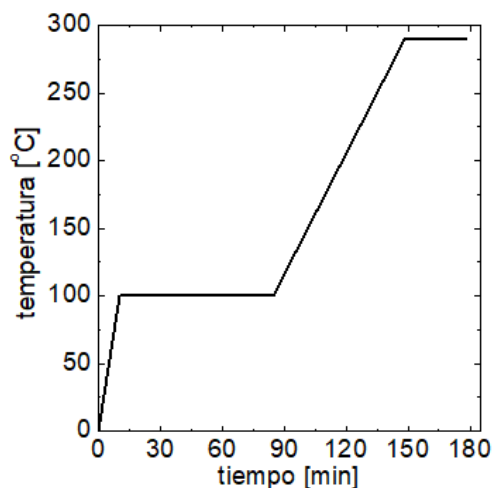


Figura 2.2: Perfil de calentamiento en una síntesis típica de MNPs de morfología cúbica.

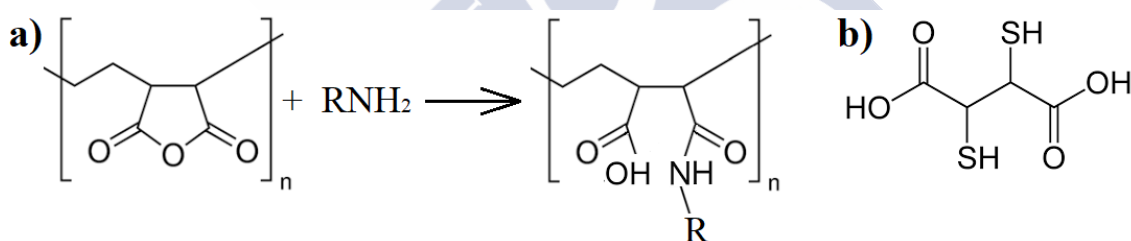
Después de dejar enfriar el sistema hasta temperatura ambiente durante aproximadamente 2 h, se añaden al reactor 50 ml de etanol y la disolución resultante se centrifuga a 1700 rpm durante 10 min., obteniéndose un precipitado de color negro. El sobrenadante es retirado y el material precipitado se dispersa en 20 ml de tolueno con 0.02 ml de ácido oleico, introduciéndolo en el baño de ultrasonidos durante aproximadamente 10 min. Esta nueva disolución se centrifuga a 750 rpm durante 5 min., con el fin de eliminar posibles agregados de MNPs. Para ello, lo que se descarta tras este proceso de centrifugación es el material precipitado. Al sobrenadante se le añaden nuevamente 50 ml de etanol y se centrifuga a 1700 rpm durante 10 min., formándose un nuevo precipitado de color negro que se dispersa en hexano de cara a la caracterización de las MNPs mediante medidas de microscopía de transmisión electrónica (TEM).

Mediante la sustitución parcial del Fe(acac)₃ por los precursores de otros elementos metálicos, se sintetizaron MNPs cúbicas de diferentes composiciones, mientras que variando parámetros como la rampa de temperatura, la concentración global de precursores metálicos, la razón molar entre estos y el agente surfactante o el

tiempo de reacción a la temperatura de reflujo se lograron sistemas de diferentes tamaños y morfologías.

2.1.3. Transferencia de los sistemas a medio acuoso

Las MNPs resultantes de las reacciones de descomposición térmica antes descritas presentan un recubrimiento de ácido oleico, un compuesto altamente hidrófobo, que hace que estas partículas sólo sean estables en disolventes orgánicos de muy baja polaridad, tales como hexano, tolueno o cloroformo. De cara a su implementación en potenciales aplicaciones biomédicas es necesario modificar la superficie de las mismas de forma que pasen a ser estables en medio acuoso previniendo, además, que este proceso no provoque su aglomeración ni la modificación de sus propiedades físicas. La transferencia de las MNPs a medio acuoso se llevó a cabo mediante dos métodos alternativos: un proceso de recubrimiento polimérico usando un complejo PMA-dodecilamina y un proceso de intercambio de ligando utilizando DMSA (Esquema 2.1).



Esquema 2.1: Representación de: a) unión de un monómero de PMA con una molécula de dodecilamina, y b) molécula de DMSA.

El proceso de transferencia de fase de las MNPs mediante la técnica de recubrimiento polimérico se llevó a cabo con el polímero PMA (peso molecular 6000 g·mol⁻¹, 39 monómeros cada molécula polimérica en promedio) modificado con dodecilamina en un 75%¹³. Para preparar este compuesto 3.084 g de PMA (20 mmol de monómeros) se mezclan con 2.780 g de dodecilamina (15 mmol) en 100 ml de THF, dando lugar a una disolución de color amarillo intenso. A continuación, bajo agitación magnética, la temperatura del sistema se incrementa a 70 °C y se mantiene a reflujo durante toda una noche, tornando el color de la disolución a un tono mucho más

transparente al cabo de unos minutos. Finalmente, se deja enfriar durante unos minutos y el disolvente es lentamente evaporado en un rotavapor hasta que el polímero modificado, con un color amarillo tenue, se encuentre completamente seco. Este se dispersa en 25 ml de cloroformo, dando lugar a una disolución con una concentración monomérica de 0.80 M.

El recubrimiento polimérico se efectúa mezclando una disolución de las MNPs en cloroformo con la disolución de PMA-dodecilamina (también en cloroformo), de forma que, variando los volúmenes añadidos de cada sistema, se puede controlar la cantidad de monómeros de PMA por cada nm² de superficie libre de las MNPs disponible. Los volúmenes a añadir se calculan siguiendo la ecuación 2.1, que se obtiene simplemente relacionando la masa total de MNPs empleadas y la consiguiente superficie libre total de estas con la densidad de monómeros deseada, desarrollando a continuación en las expresiones resultantes las fórmulas de la superficie y el volumen de una partícula de forma cúbica en función de su longitud de arista.

$$V_{PMA} = \frac{6 \cdot 10^{21} \cdot C_{NP} \cdot V_{NP} \cdot X}{N_A \cdot C_{PMA} \cdot \rho_{NP} \cdot D_{NP}} \quad (2.1)$$

siendo V_{PMA} el volumen de la disolución del complejo PMA-dodecilamina en cloroformo [ml], C_{NP} la concentración de la disolución de MNPs en cloroformo [g·l⁻¹], V_{NP} el volumen de la disolución de MNPs en cloroformo [ml], X el número de monómeros deseados por nm² de superficie libre de MNPs [nm⁻²], N_A el número de Avogadro [6.02·10²³ mol⁻¹], C_{PMA} la concentración molar de la disolución de PMA en cloroformo [mol·l⁻¹], ρ_{NP} la densidad de las MNPs [g·ml⁻¹] y D_{NP} el tamaño de arista de las MNPs cúbicas [nm].

Por su parte, la densidad superficial de monómeros de PMA necesaria para que los sistemas magnéticos sean estables, en función de su tamaño, fue determinada experimentalmente mediante la observación visual de la estabilidad de las MNPs tras ejecutar el proceso de funcionalización, que se describirá a continuación, con distintas cantidades de polímero. Las cantidades mínimas de polímero que necesitan ser implementadas para lograr que los nanocubos presenten un elevado grado de estabilidad en medio acuoso tras llevar a cabo el proceso modificación superficial se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Densidad superficial de monómeros de PMA que se necesita implementar en el proceso de funcionalización para que las MNPs sean estables en función de su tamaño.

Tamaño MNPs [nm]	Densidad superficial monómeros de PMA [nm⁻²]
25 – 30	3000
30 – 35	5000
35 – 40	7000
40 – 45	9000

Una vez efectuada la mezcla, esta se introduce en el baño de ultrasonidos durante 30 s y, a continuación, el disolvente se elimina lentamente usando un rotavapor hasta que la dispersión de MNPs se encuentra totalmente seca, llevando el proceso de evaporación un tiempo de aproximadamente 90 min. bajo condiciones de temperatura y presión de 45 °C y 500 mbar, respectivamente. A continuación, se añaden 50 ml de cloroformo y se repite el proceso de evaporación dos veces más, con el objetivo de maximizar la cantidad de polímero modificado que se une a la superficie del sistema magnético. Tras esta última evaporación, se añaden 50 ml de una disolución tampón SBB12 (concentración de 50 mM de borato de sodio en agua, pH 12) a las MNPs secas y estas se agitan durante 90 min. a 45 °C con el fin de favorecer la transferencia de las MNPs a la fase acuosa. Finalmente, las partículas son recolectadas del medio SBB12 con un imán y se disuelven en agua miliQ. De cara a eliminar el posible exceso de polímero presente en estas últimas disoluciones acuosas se repite el proceso de precipitación con imán una vez más.

Por su parte, el proceso de transferencia de fase de las MNPs mediante la técnica de intercambio de ligando con DMSA es el que se detalla a continuación^{16,17}: 25 mg de MNPs se dispersan en 12 ml de tolueno y, a continuación, se les añade una disolución formada por 45 mg de DMSA en 2.5 ml de DMSO. La disolución resultante se introduce en un baño de ultrasonidos y se sonica durante 10 min. a 200 W y, a continuación, se agita mecánicamente a temperatura ambiente durante 24 h a una velocidad de 100 rpm. Posteriormente, a la disolución resultante se le añaden 20 ml de etanol y las MNPs se precipitan con un imán, repitiendo este proceso de lavado 5-6

veces más. El material precipitado tras el último lavado se redispersa en agua a pH 10 con el fin de desprotonar uno de los grupos carboxílicos del DMSA para lograr una mejor dispersión. Por último, las MNPs son nuevamente precipitadas con un imán, resuspendidas en agua miliQ y sometidas a un proceso de diálisis durante 48 h utilizando una membrana semipermeable con un tamaño de poro de 100 KDa.

2.1.4. Análisis del nivel de recubrimiento, agregación y estabilidad coloidal de las MNPs

Los grados de agregación y homogeneidad de los sistemas funcionalizados fueron estudiados a través de medidas del tamaño hidrodinámico, efectuadas mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). El correcto recubrimiento de las MNPs con los compuestos ensayados, por su parte, fue corroborado por espectroscopía infrarroja y velocimetría Doppler, midiendo mediante esta última las movilidades electroforéticas a partir de las cuales, aplicando la ecuación de Smoluchowsky¹⁸, se determinaron sus potenciales zeta (ζ).

Finalmente, se estudió la estabilidad de los diferentes tipos de MNPs cúbicas en distintos fluidos biológicos durante un periodo mínimo de 96 h, a través de la evolución temporal del tamaño hidrodinámico de las partículas. Los medios analizados fueron:

- Solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.4.
- Solución de ácido 4-2-(hidroxietil)piperacina-1-etanosulfónico (HEPES), pH 7.4.
- DMEM con L-glutamina (1%) y penicilina/estreptomicina (1%).
- DMEM con L-glutamina (1%), penicilina/estreptomicina (1%) y FBS (10%).
- Disoluciones cloruro de sodio (NaCl) en agua de distintas concentraciones entre 0.01 M y 2.50 M.
- Medio fagolisosomal (PSF) pH 4.5. Composición: glicina ($0.059 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), cloruro de sodio ($3.21 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), sulfato de sodio ($0.039 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), cloruro de calcio ($0.128 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), fosfato de sodio dibásico ($0.071 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) y ftalato de potasio ($0.110 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) en agua.

2.1.5. Técnicas de caracterización

Para determinar la forma y el tamaño de las MNPs se obtuvieron imágenes de TEM utilizando un microscopio electrónico de transmisión modelo *Phillips CM-12* operando bajo un voltaje de aceleración de 120 kV en un rango de 100000 a 300000X. Las imágenes de microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (HRTEM) y los patrones de difracción de electrones en área seleccionada (SAED) se realizaron con un microscopio de transmisión electrónica de alta resolución, modelo *Carl-Zeiss Libra 200 FE-EF TEM* operando a 200 kV. La preparación de las muestras se llevó a cabo depositando un volumen de 10 μ l de las disoluciones de MNPs, previamente diluidas hasta alcanzar un color marrón muy tenue, sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono que, posteriormente, se secaba bajo condiciones ambientales durante un periodo aproximado de 2 h.

El tamaño hidrodinámico y el potencial ζ de las MNPS preparadas fueron determinados por DLS y velocimetría Doppler, respectivamente, usando un equipo *Nano ZS (Nanoseries, Malvern Instruments)*. Para la preparación de las muestras, las MNPs fueron diluidas en agua y en los diferentes medios biológicos comentados previamente hasta que los sistemas tomaron un color marrón muy tenue. Se realizaron para cada uno de los sistemas estudiados tres medidas independientes del tamaño hidrodinámico y de la movilidad electroforética, a partir de la cual se determinó el potencial ζ .

Las medidas de difracción de rayos X de polvo cristalino (XRD) se efectuaron con un difractómetro *Phillips* manejado con una unidad de control modelo *PW1710*, un goniómetro vertical modelo *PW1820/00* y un generador modelo *Enraf Nonius FR590*, operando a 40 kV y 30 mA. Los rayos X se obtuvieron de un tubo sellado de cobre y la radiación fue monocromatizada con un monocromador de grafito. La detección de rayos X se efectuó con un detector de área tipo *PANalytical PIXcel-3*. Los difractogramas se midieron en el rango angular 10°-70° con un ángulo de paso de 0.02° y un tiempo de paso de 2 s. Para efectuar las medidas de difracción de rayos X las muestras fueron precipitadas a temperatura ambiental mediante centrifugación a 1700 rpm durante 10 min. y secadas durante 24 h bajo unas condiciones de temperatura y presión de 60 °C y 100 mbar, respectivamente.

Los datos de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se midieron en un espectrofotómetro FTIR *modelo IFS-66v (Bruker)* con un accesorio *ZnS ATR*. El espectro se obtuvo en el rango $4000\text{-}250\text{ cm}^{-1}$ con un paso de 2 cm^{-1} . Las muestras fueron preparadas siguiendo un proceso de precipitación y secado como el seguido para llevar a cabo las medidas de XRD.

La composición y concentración metálica de los sistemas de MNPs se determinaron mediante espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El equipo utilizado fue un ICP-MS *modelo Agilent 7700x* con sistema de introducción de muestras formado por un nebulizador *Micromist glass slow-flow*, una cámara de spray de vidrio de doble paso con sistema Peltier y una antorcha de cuarzo, trabajando a una potencia de 1550 W y un flujo de plasma de $15\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$. Para la preparación de las muestras, $20\text{ }\mu\text{l}$ de las disoluciones originales fueron diluidos en $480\text{ }\mu\text{l}$ de una mezcla 75:25 (v/v) de disoluciones de ácido clorhídrico 37% y ácido nítrico 69% en agua (agua regia) durante 2 h. Posteriormente, se añadieron 4.5 ml de ácido nítrico en agua al 1% (v/v), compuesto que sirve para neutralizar el agua regia y que, además, actúa como agente de limpieza ante la posible presencia de trazas de iones metálicos de medidas previas que hayan permanecido en los conductos del sistema de nebulización del equipo.

La caracterización magnética de los sistemas fue efectuada en un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) *modelo DMS-1660*. Las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado de las muestras estudiadas se midieron desde -50000 Oe a $+50000\text{ Oe}$ a diferentes temperaturas entre 5 K y 300 K , registrando los datos en los intervalos indicados en la Tabla 2.2. En algunas medidas, debido a problemas de funcionamiento del equipo, solo se pudieron aplicar campos magnéticos en uno y otro sentido con una amplitud máxima de 10000 Oe . Las curvas de enfriamiento en ausencia y presencia de campo magnético (ZFC y FC) se midieron desde 300 K hasta 5 K , la segunda de ellas bajo un campo aplicado de 1000 Oe , registrando la magnetización en intervalos de 10 K . Para la medida de sus propiedades magnéticas, las MNPs fueron precipitadas y secadas de igual forma que se hizo para las medidas de XRD antes explicadas.

Tabla 2.2: Protocolo de variación del campo magnético para la obtención de los ciclos de histéresis de los sistemas de MNPs cúbicas ($1 \text{ T} = 10^4 \text{ Oe}$).

	$\vec{B}_{\text{inic}} [\text{T}]$	$\vec{B}_{\text{fin}} [\text{T}]$	$\Delta\vec{B} [\text{T}]$		$\vec{B}_{\text{inic}} [\text{T}]$	$\vec{B}_{\text{fin}} [\text{T}]$	$\Delta\vec{B} [\text{T}]$
Etapas 1	5.0	1.0	-0.50	Etapas 6	-5.0	-1.0	+0.50
Etapas 2	1.0	0.1	-0.05	Etapas 7	-1.0	-0.1	+0.05
Etapas 3	0.1	-0.1	-0.02	Etapas 8	-0.1	0.1	+0.02
Etapas 4	-0.1	-1.0	-0.05	Etapas 9	0.1	1.0	+0.05
Etapas 5	-1.0	-5.0	-0.50	Etapas 10	1.0	5.0	+0.50

2.2. Resultados y discusión

2.2.1. Influencia de las condiciones sintéticas y caracterización estructural de las MNPs de forma cúbica

En una síntesis típica, como la descrita en la sección Materiales y Métodos, se obtienen nanocubos de óxido de hierro con un tamaño de arista de $48.0 \pm 4.0 \text{ nm}$, tal y como se puede observar en la imagen de TEM y en el histograma de la distribución estadística de tamaños de la Figura 2.3. Las MNPs presentan una distribución de tamaños estrecha y la morfología cúbica está bien definida, con una amplia mayoría de MNPs con caras perfectamente planas.

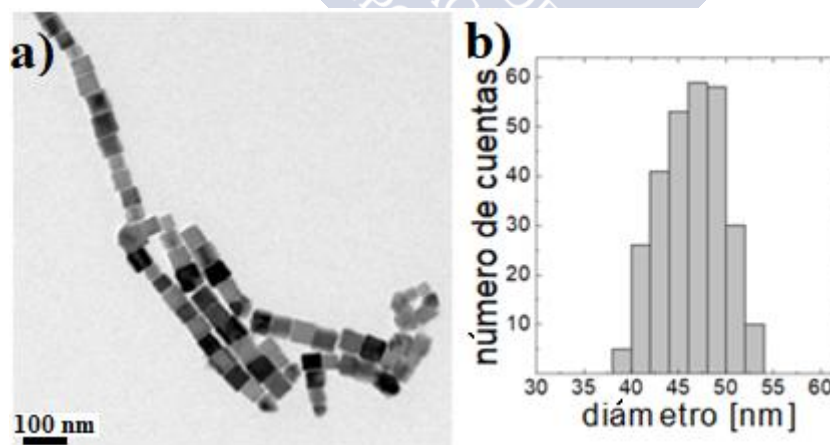


Figura 2.3: a) Imagen TEM y b) histograma de distribución de tamaños de los nanocubos obtenidos en una síntesis típica.

La disposición de los nanocubos en forma de cadenas unidimensionales al ser secados para su observación mediante TEM, denota la existencia de fuerzas dipolares entre los mismos¹⁹. La aparición de estas fuerzas atractivas se asocia con el presumible carácter ferrimagnético que presentan las MNPs dadas sus dimensiones²⁰. La estructura cristalina de las MNPs cúbicas resultantes de esta síntesis típica fue estudiada mediante medidas de difracción de rayos X (XRD), difracción de electrones en área seleccionada (SAED) y microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM). El patrón de difracción de rayos X (Figura 2.4a) muestra unos picos cuyas posiciones indican que la fase cristalina predominante en el sistema sintetizado es la de la magnetita, Fe_3O_4 . Nótese que las posiciones e intensidades relativas de los principales picos característicos en las medidas de XRD son muy similares en las estructuras de magnetita y maghemita²¹ (Figura 2.4b), pero la no presencia de los picos menores característicos de esta última forma son prueba fehaciente de que la estructura de las MNPs sintetizadas es Fe_3O_4 . Por otra parte, el equipo en el que se efectuó esta medición interpretaba automáticamente el espectro obtenido, confirmando la magnetita como forma cristalina más abundante en el sistema.

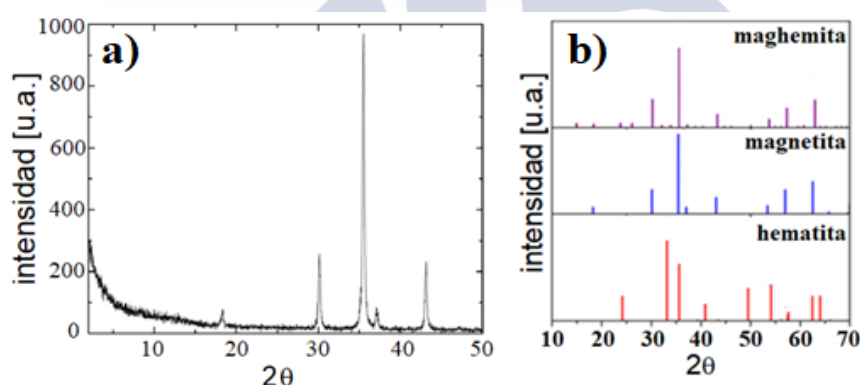


Figura 2.4: a) Difractograma de rayos X de las MNPs cúbicas resultantes de una síntesis típica, y b) posiciones típicas de los picos en los espectros de difracción de rayos X de las formas más comunes de óxido de hierro: maghemita, magnetita y hematita, respectivamente. Adaptada de la ref. 21. Copyright (2015) con permiso de *Taylor&FrancisGroup*.

El patrón de difracción SAED de un nanocubo se muestra en la Figura 2.5a, en la cual la aparición de puntos brillantes y no de anillos difusos indica que la muestra estudiada presenta una alta cristalinidad. Las reflexiones observadas en el patrón de difracción de electrones definen unos anillos concéntricos cuyos radios se corresponden

con el inverso de la inter-distancia entre los planos cristalinos adyacentes asociados²². Esta información, sumada al conocimiento del parámetro de red de la estructura cúbica de la magnetita²³ ($z = 0.8399$ nm), nos permite determinar, siguiendo la ecuación 2.2, que la reflexiones observadas se corresponden a los planos cristalinos $\langle 220 \rangle$, $\langle 311 \rangle$, $\langle 400 \rangle$ y $\langle 440 \rangle$.

$$d = R^{-1} = \frac{(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}}{z} \quad (2.2)$$

donde d es la interdistancia entre planos, R el radio de los anillos determinados por la reflexiones observadas en el patrón de difracción SAED, z el parámetro de red de la estructura cúbica de la magnetita y h , k y l los índices de Miller que sirven para identificar a las distintas familias de planos cristalinos²⁴.

Por su parte, en las imágenes de HRTEM (Figura 2.5b) se puede observar, mediante muy sutiles diferencias de contraste, la existencia de una familia de planos que transcurren paralelos a las aristas de los nanocubos y la de otra que corre en diagonal a las caras de los mismos. La medición de las inter-distancias entre los planos de dichas familias nos permite determinar que los primeros son los planos $\langle 400 \rangle$ mientras que los segundos son los planos $\langle 220 \rangle$. La morfología cúbica de las MNPs es consecuencia del crecimiento más lento en la dirección $\{100\}$ que en otras direcciones debidos a la forma en la que el agente estabilizante, dada la cantidad del mismo empleado, se une a las superficies en crecimiento²⁵.

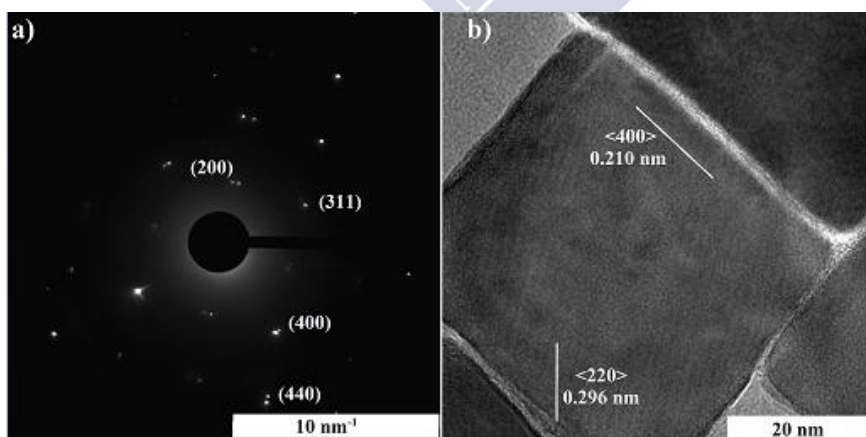


Figura 2.5: a) Patrón de difracción SAED y b) imagen de HRTEM mostrando las distancias inter-planares características observadas en las MNPs de morfología cúbica resultantes de la síntesis típica.

Es también destacable la diferencia de contraste que se observa entre distintos nanocubos en las imágenes de TEM, mostrando algunos de ellos una tonalidad mucho más oscura que otros. Esta podría ser debidas a la presencia de MNPs de composición no uniforme, potencialmente constituidas por una estructura núcleo-coraza con un pequeño núcleo de hierro metálico (ya sea un núcleo bien definido o en forma de pequeñas “islas”) rodeado de un recubrimiento principal de óxido de hierro. No obstante, el origen más probable puede encontrarse en las diferentes orientaciones relativas de las MNPs sobre la rejilla de carbono en dónde fueron depositadas para su observación al microscopio, es decir, que se encuentren orientadas según diferentes planos. Una tercera razón puede ser la oxidación parcial de ciertas partículas durante el proceso de lavado, lo cual sería posible dado que dicho proceso se lleva a cabo en condiciones ambientales, en ausencia de atmósfera inerte, y en determinadas etapas, tras precipitarlas con etanol o colectarlas con un imán, las MNPs se encuentran secas en contacto con el aire.

En lo referente a la capa del agente surfactante/estabilizante (ácido oleico) que estabiliza a las partículas, esta puede ser directamente observada en las imágenes de HRTEM como una fina película alrededor de las MNPs con un contraste mucho más claro que las mismas (Figura 2.5b). Además, su presencia fue corroborada adicionalmente mediante medidas de FTIR. La banda ancha situada en $3130\text{-}3630\text{ cm}^{-1}$ se corresponde con las vibraciones de los enlaces O-H, mientras que las bandas más estrechas a 2923 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} se asocian, respectivamente, con el modo vibracional simétrico de las terminaciones metilo y los modos vibracionales simétrico y anti-simétrico de las terminaciones metileno del ácido oleico. Las bandas características en 1560 cm^{-1} y 1443 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones simétricas y anti-simétricas de las terminaciones COO^- . Todo ello indica que las cadenas de ácido oleico se unen a las MNPs mediante dobles enlaces de sus átomos de carbono con los átomos de oxígeno de la estructura de la magnetita²⁶. Finalmente, el enlace Fe-O se observa en la banda situada a 545 cm^{-1} (Figura 2.6).

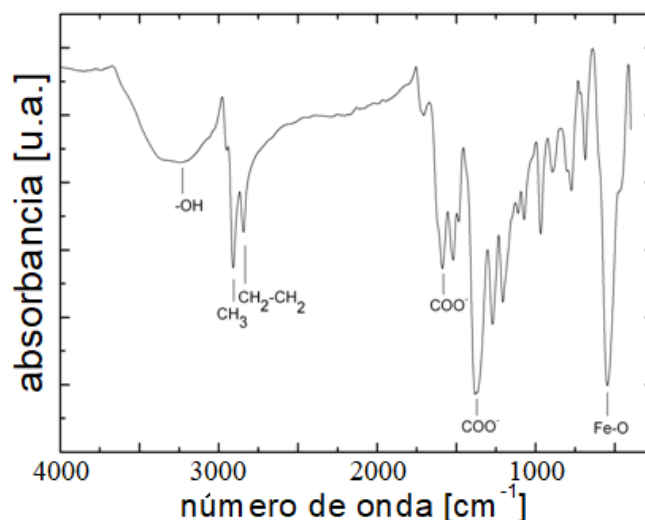


Figura 2.6: Espectro FTIR de los nanocubos de 48.0 ± 4.0 nm recubiertos de ácido oleico obtenidos en la síntesis típica.

Por último, se estudió la evolución del tamaño, morfología y monodispersidad de las MNPs durante el proceso de preparación de las mismas. Para tal fin, fue llevada a cabo una síntesis típica en la que, en determinados tiempos, se extraía del reactor, con ayuda de una jeringuilla de vidrio, una alícuota de aproximadamente 0.50 ml a la que posteriormente se le efectuaba el proceso de lavado habitual, previo a la preparación de la rejilla para la visualización de las MNPs mediante TEM. Las alícuotas fueron tomadas tanto durante la rampa de calentamiento desde 100 °C hasta reflujo, a las temperaturas de 220 °C y 255 °C, como una vez alcanzada dicha temperatura de reflujo e iniciados los 30 min. de reacción, tras 2, 7, 12, 17, 22, 26 y 30 min. (Figura 2.7a). Así, el tamaño de las MNPs evolucionó de forma progresiva desde los 42.3 ± 6.8 nm tras 2 min. de reacción hasta los 49.0 ± 4.2 nm medidos una vez completada la reacción (30 min., Figura 2.7b). La morfología de las MNPs fue difícil de establecer durante la rampa de calentamiento, dado su muy reducido tamaño y su alto nivel de agregación. Una vez alcanzada la temperatura de reflujo, las MNPs ya mostraban un tamaño próximo al definitivo, mientras que la morfología estaba aún poco definida, con un bajo número de partículas cúbicas. Transcurridos 17 min. de reacción se observó un alto porcentaje de nanocubos con caras perfectamente planas y una alta monodispersidad en tamaños, características estas que se mantienen hasta el final de la misma (Figura 2.8).

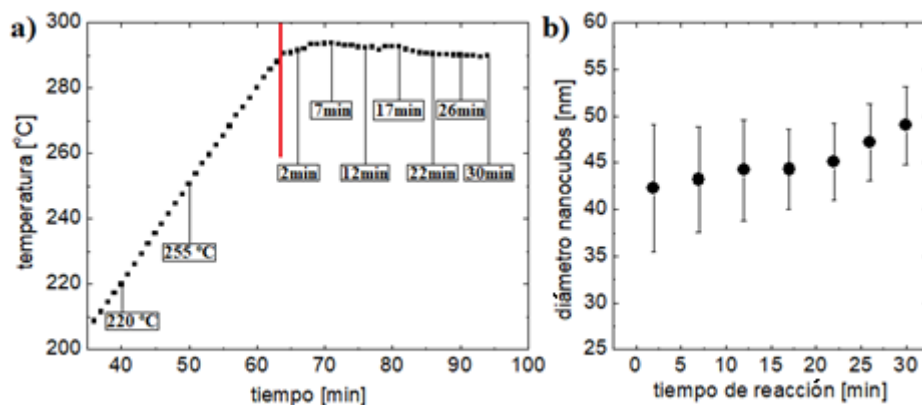


Figura 2.7: a) Curva experimental de calentamiento con los momentos de extracción de las alícuotas; y b) variación del tamaño de las MNPs durante la reacción a temperatura de reflujo.

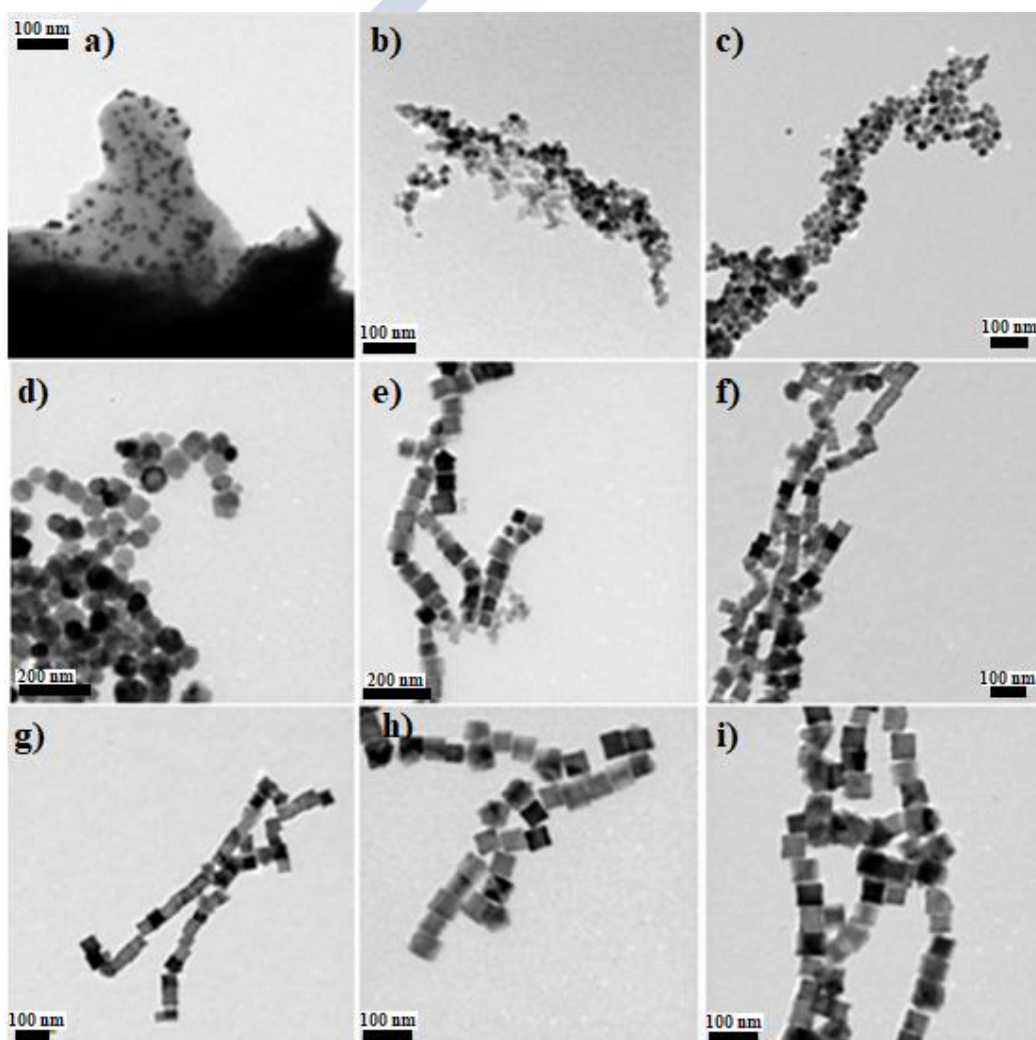


Figura 2.8: Imágenes de TEM de las MNPs en diferentes momentos del proceso de síntesis: Durante el proceso de calentamiento a: a) 220 °C y b) 255 °C; y una vez iniciado el tiempo de reacción a temperatura de reflujo tras c) 2, d) 7, e) 12, f) 17, g) 22, h) 26 e i) 30 min.

A continuación, con el fin de optimizar el proceso sintético, se variaron diversos parámetros del mismo, tales como la concentración del precursor magnético⁷, el tiempo, y/o la temperatura de reacción^{27,28}, entre otros, obteniéndose MNPs de diferentes tamaños y con morfologías cúbicas más o menos definidas. Además, mediante la modificación de magnitudes como la razón molar entre precursor magnético y el ácido oleico²² o la velocidad/rampa de calentamiento²⁹, se lograron también MNPs de formas octaédricas y cubooctaédricas.

Por otra parte, la sustitución parcial del $\text{Fe}(\text{acac})_3$ por otros precursores magnéticos de diferentes elementos de la misma familia de los acetilacetatos, tales como $\text{Mn}(\text{acac})_2$, $\text{Zn}(\text{acac})_2$ o $\text{Co}(\text{acac})_2$, dio lugar a la formación de MNPs cúbicas con diferentes grados de dopaje³⁰ y, por tanto, con distintas características y propiedades magnéticas, como se explicará en detalle en el Apartado 2.2.1.5.

2.2.1.1. Influencia de la etapa de vacío y de la concentración de precursor férrico

Como se ha comentado previamente, el proceso sintético implementado se basa en la descomposición térmica de un precursor organometálico del hierro, el $\text{Fe}(\text{acac})_3$, en el seno de un disolvente orgánico de alto punto de ebullición (éter bencílico) en presencia de un compuesto surfactante/estabilizante como es el ácido oleico¹⁵. Las cantidades de estos compuestos, así como los diferentes parámetros de la síntesis, afectan a la química de la reacción de descomposición y, por tanto, a la nucleación y crecimiento de los nanocristales que se forman. De esta forma, mediante un preciso control de dichas variables, podemos controlar el tamaño y la morfología de las MNPs resultantes³¹.

En este sentido, en primer lugar es especialmente destacable el hecho de que la retirada de la etapa de vacío primario a 10 mbar³² apenas produce variaciones significativas en la morfología y el tamaño de las partículas, lográndose MNPs con características muy similares a las obtenidas cuando se realiza la etapa de vacío primario a 100 °C durante 30 min. (Figura 2.9).

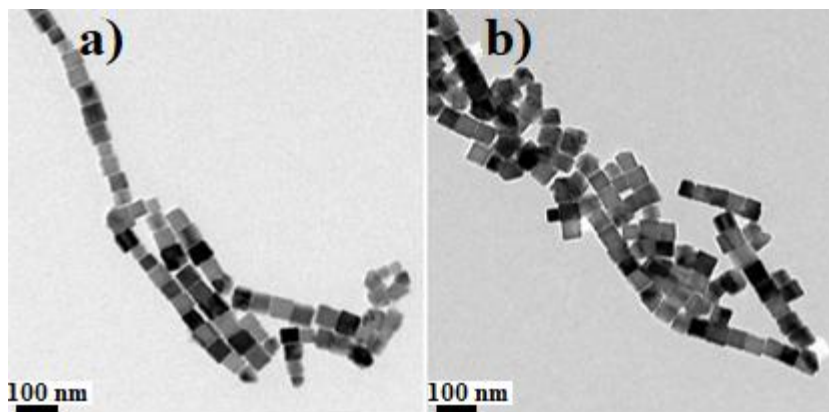


Figura 2.9: Imágenes de TEM de los nanocubos obtenidos tras la síntesis típica a) en presencia y b) ausencia de la etapa de vacío a 100 °C.

El tamaño de las MNPs cúbicas puede ser modificado siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito previamente, variando tan solo algún parámetro como la concentración del precursor magnético, la velocidad de calentamiento o el tiempo de reacción a 290 °C. Así, por ejemplo, modificando la concentración de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ desde 56 mM hasta 269 mM (200 mM es la concentración molar en la síntesis típica que da como resultados nanocubos de aproximadamente 50 nm) el tamaño de los nanocubos puede ser variado progresivamente desde 27.8 ± 4.1 nm hasta 94.2 ± 9.9 nm (Figuras 2.10 y 2.11a-g), obteniendo en todos los casos MNPs altamente monodispersas y con una morfología cúbica bien definida, especialmente en las de mayor tamaño. A concentraciones inferiores al rango mencionado, las MNPs resultantes pierden la morfología cúbica y presentan elevados grados de polidispersidad y agregación (Figura 2.11h-i). La concentración de precursor ferroso es, por tanto, un parámetro que permite variar el tamaño de las MNPs dentro de un rango de tamaños muy elevado, conservando estas en todo momento la morfología cúbica deseada. En la Tabla 2.3 se muestran las diferentes concentraciones de precursor ferroso ensayadas, así como las cantidades concretas del mismo y de éter bencílico utilizadas para la preparación de las disoluciones precursoras y el tamaño de las MNPs obtenidas en cada caso. Las cantidades de ácido oleico se variaron de forma que en todas las síntesis se mantuviese la razón molar $R=2$ entre el precursor ferroso y el agente surfactante.

Tabla 2.3: Cantidades de reactivos utilizadas en las síntesis con diferentes concentraciones de precursor ferroso y tamaño de arista de los nanocubos resultantes.

M (Fe(acac)₃) [mmol]	V (éter benc.) [ml]	C (Fe(acac)₃) [mM]	Tamaño MNPs [nm]
2.69	10	269	94.2 ± 9.9
2.41	10	241	56.3 ± 6.6
2.00	10	200	48.0 ± 4.0
2.00	20	100	41.1 ± 3.1
1.60	20	80	40.2 ± 4.0
1.42	20	71	33.3 ± 3.9
1.42	25	56	27.8 ± 4.1
1.20	25	48	-
0.85	25	34	-
0.50	25	20	-

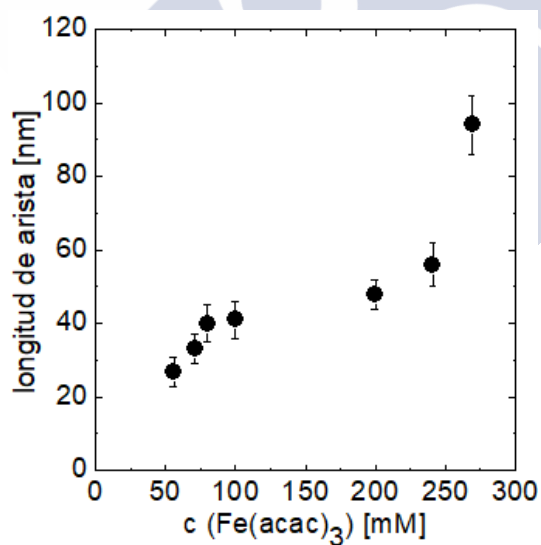


Figura 2.10: Representación gráfica del tamaño de arista de los nanocubos de óxido de hierro obtenidos frente a la concentración de precursor ferroso implementada en las disoluciones precursoras.

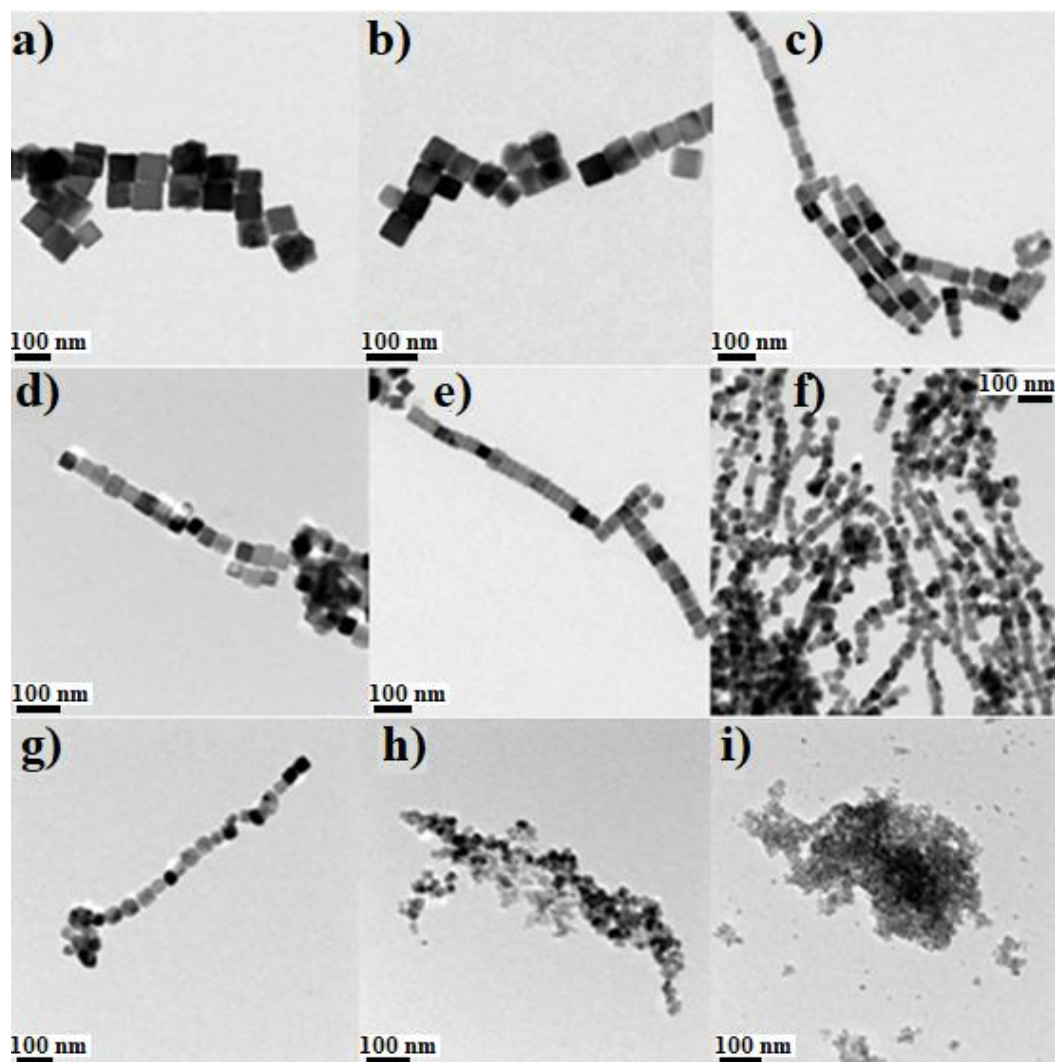


Figura 2.11: Imágenes TEM de los sistemas magnéticos obtenidos en las síntesis con concentraciones de precursor ferroso de a) 269 mM, b) 241 mM, c) 200 mM, d) 100 mM, e) 80 mM, f) 71 mM, g) 56 mM, h) 48 mM e i) 34 mM.

2.2.1.2. Influencia del tiempo y la temperatura de reacción

Por su parte, si el tiempo de reacción a 290 °C se incrementa de los 30 min. de la síntesis típica a 60 ó 90 min., los nanocubos resultantes poseen una morfología cúbica más perfecta y con unas longitudes de arista superiores a las de las MNPs obtenidas en la misma, de 58.2 ± 5.4 nm y 66.2 ± 5.8 nm, respectivamente (Figura 2.12c-d). Adicionalmente, también se probó a reducir el tiempo de reacción a 15 min., obteniéndose MNPs cúbicas con longitudes de arista de ca. 50 nm (Figura 2.12a), pero con un grado de polidispersidad en cuanto a forma y tamaño mucho más elevado, con

importantes poblaciones de MNPs con unas aristas más curvadas que en síntesis anteriores y con tamaños bastante alejados del valor promedio de 50 nm. En esta última síntesis, la abundante presencia de pequeñas MNPs/material magnético en los alrededores de las MNPs cúbicas de mayor tamaño, observado en las imágenes de TEM, puede asociarse a una no terminación del proceso de formación de las NPs como consecuencia del reducido tiempo de reacción²². Además, se comprobó que la reducción del tiempo de reacción no sólo proporciona partículas de peor calidad, sino que el rendimiento del proceso sintético también decae notablemente, obteniendo una masa final de material magnético menor que en otras síntesis con mayor tiempo de reacción a temperatura de reflujo.

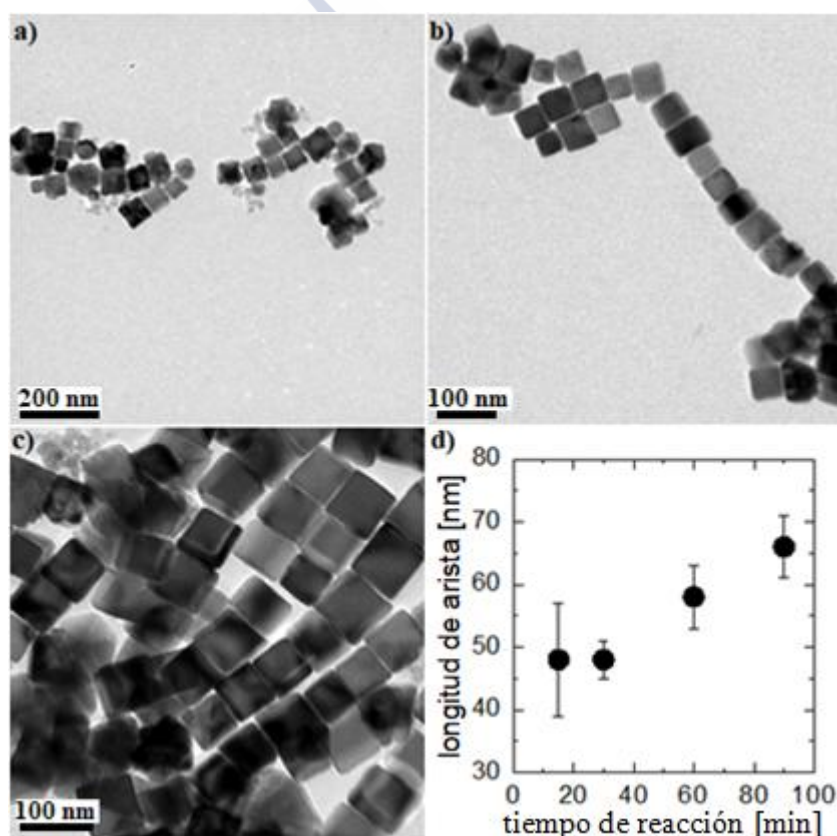


Figura 2.12: Imágenes de TEM de nanocubos obtenidos tras un tiempo de reacción a 290 °C de a) 15 min., b) 60 min. y c) 90 min.; d) representación gráfica del tamaño de los nanocubos frente al tiempo de reacción.

Además, se ha estudiado cómo afecta a la formación de las MNPs la reducción de la temperatura de reacción, pasando de los 290 °C ensayados en todas las síntesis

implementadas hasta el momento a un valor de 265 °C, manteniendo constantes los demás parámetros de la llamada síntesis típica. A esta temperatura, la disolución muestra un reflujo mucho menos intenso que a 290 °C, consecuencia lógica de la diferencia con respecto a la temperatura de ebullición del éter bencílico empleado como disolvente. Con esta variación en el proceso sintético, el tamaño de las MNPs cúbicas obtenidas aumenta ligeramente, pasando a un valor de 57.0 ± 7.9 nm (Figura 2.13). Sin embargo, al igual que sucedía al reducir el tiempo de reacción a 15 min., también aumenta de forma considerable el grado de polidispersidad de las MNPs, formándose abundantes MNPs de un tamaño muy reducido debido, presumiblemente, de nuevo a la incompleta descomposición del precursor magnético. Asimismo, el rendimiento del proceso sintético también vuelve a ser menor del habitual²², consiguiéndose una masa final de material magnético tras los procesos de lavado que apenas representa un 50% de la obtenida en la síntesis típica.

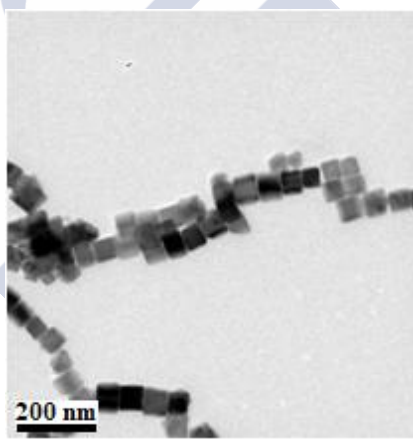


Figura 2.13: Imagen de TEM de los nanocubos obtenidos en una síntesis a una temperatura de reacción de 265 °C.

2.2.1.3. Influencia de la velocidad de calentamiento

El tamaño de los nanocubos también pudo ser controlado variando la velocidad de calentamiento desde los 100 °C a los que se genera la atmósfera inerte de nitrógeno hasta los 290 °C a los que tiene lugar la reacción de descomposición térmica. En particular, a medida que se aumenta ritmo de incremento de temperatura, se obtienen MNPs de morfología cúbica de tamaños menores. En las Figuras 2.14a-c se observa que al aumentar la pendiente de la rampa de temperatura desde los $3\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ de la síntesis

típica a 7, 10 y 13 °C·min⁻¹ el tamaño de arista de los nanocubos resultantes pasa a ser 46.0 ± 4.1 , 39.0 ± 4.4 y 36.6 ± 5.0 nm respectivamente, con morfologías cúbicas bien definidas y un alto grado de monodispersidad, excepto en el último caso dónde el sistema de MNPs resultante es visiblemente más polidisperso. En general, cuanto más elevada sea la velocidad de calentamiento más intenso será el proceso de nucleación, por una parte, y se reducirá el tiempo del período de crecimiento, por otra, dando lugar a sistemas de partículas de tamaño progresivamente más reducido.

Sin embargo, si la pendiente de la rampa de temperatura se incrementa a 16 °C·min⁻¹ las MNPs resultantes adquieren una forma de octaedros truncados (Figura 2.14d) con un tamaño de 52.1 ± 6.1 nm. Este tamaño de partícula se corresponde con la distancia entre vértices opuestos de la misma. Este comportamiento guarda cierta consistencia con la imagen donde se observan las partículas resultantes de la síntesis realizada a una rampa de temperatura de 13 °C·min⁻¹ (Figura 2.14c), dónde ya se puede observar una considerable población de MNPs con esta misma morfología octaédrica.

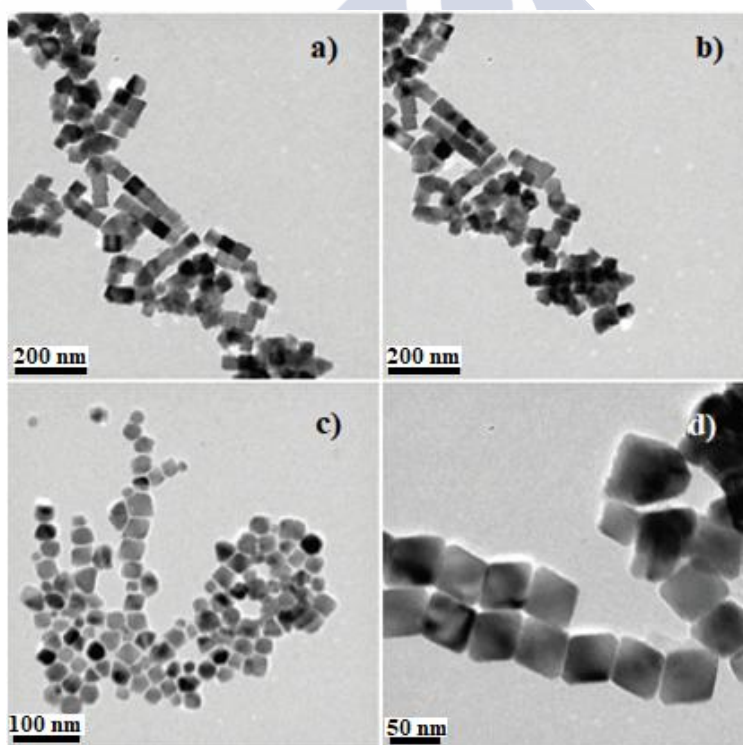


Figura 2.14: Imágenes de TEM de las MNPs obtenidas tras las síntesis con rampas de temperatura de a) 7 °C·min⁻¹, b) 10 °C·min⁻¹, c) 13 °C·min⁻¹ y d) 16 °C·min⁻¹.

La geometría octaédrica antes comentada puede provenir del comportamiento del ácido oleico como agente estabilizante: a velocidades de calentamiento elevadas, las moléculas de ácido oleico (con carga eléctrica neta negativa) promueven el crecimiento de las MNPs según los planos $\langle 111 \rangle$. Esta familia de planos sólo contiene cationes Fe^{2+} y Fe^{3+} , por lo que está cargada positivamente, de modo que su estabilización por parte de este tipo de molécula resulta electrostáticamente más favorable que la de los planos de la familia $\langle 100 \rangle$, que no poseen carga neta. Sin embargo, la superficie polar (111) no es energéticamente estable. Goniakowsky *et al.*³³ observaron que los sistemas de nanopartículas tienden a modificar espontáneamente la distribución de cargas o bien la composición y configuración de su superficie a fin de “evitar” inestabilidades energéticas de esta índole, pudiendo entonces las MNPs adoptar esta morfología octaédrica observada.

Las imágenes de HRTEM nos proporcionan más información relevante acerca de la naturaleza cristalina de estas MNPs octaédricas obtenidas en la síntesis con un ritmo de incremento de temperatura de $16\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 2.15a). En este caso, los planos cristalinos se observan de forma muy clara en las imágenes, en las que se puede medir una distancia inter-planar de 0.488 nm que se corresponde de forma prácticamente exacta con la distancia entre los planos $\langle 111 \rangle$ en los nanocristales de magnetita. Esto está en concordancia con el patrón de difracción SAED (Figura 2.15b), por lo que se puede concluir que la superficie de estas MNPs octaédricas está delimitada por los planos cristalográficos $\langle 111 \rangle$. El reducido grosor de los puntos en el patrón SAED indica la existencia de defectos o impurezas en la estructura interior de las MNPs, lo que se corrobora por la diferencia de contraste observada entre las distintas partículas en las imágenes de TEM, fenómeno cuyas posibles causas ya fueron comentadas con anterioridad. Dado que lo que se observa en la imágenes de TEM son las proyecciones en dos dimensiones de los objetos, las MNPs octaédricas aparecen en las imágenes que se obtuvieron de este sistema magnético como hexágonos, rectángulos y/o rombos (Figuras 2.15c-e), que son las tres posibles proyecciones de un octaedro en dos dimensiones³⁴.

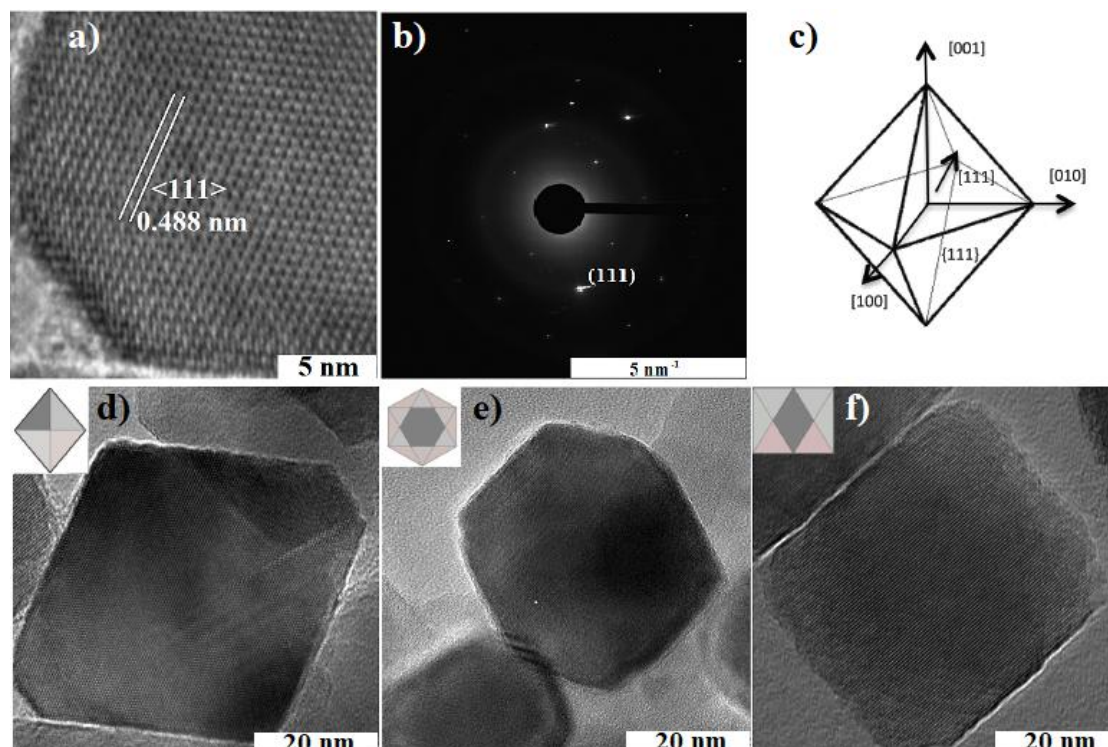


Figura 2.15: a) Imagen HRTEM, mostrando las distancias inter-planares características y b) patrón de difracción SAED de las MNPs con forma octaédrica. c) Representación esquemática de un octaedro indicando los principales ejes cristalinos y d), e), f) Imágenes HRTEM de octaedros mostrados según sus diferentes proyecciones 2D y dibujos esquemáticos de las mismas: rombos, hexágonos y rectángulos, respectivamente.

2.2.1.4. Influencia de la razón molar entre agente estabilizante y precursor férrico

Por último, la variación de la forma y el tamaño de las MNPs resultantes en la reacción de descomposición térmica también es posible mediante la modificación de la razón molar entre el agente estabilizante (ácido oleico) y el precursor magnético ($\text{Fe}(\text{acac})_3$). En la síntesis típica y en todas las modificaciones descritas hasta el momento, esta razón se mantuvo en $R=2$ (las cantidades concretas eran 4 mmol de ácido oleico por 2 mmol de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, excepto en aquellas síntesis en las que ensayamos diferentes concentraciones del precursor ferroso, en las que se modificaron las cantidades pero manteniendo la misma razón molar). Así, si se disminuye esta razón a $R=1.5$ se obtienen MNPs poliédricas con un tamaño de 46 ± 10 nm (Figura 2.16a). Por su parte, en la síntesis a razón $R=1.75$ se forman MNPs de forma cúbica, con un tamaño en este caso de 63 ± 10 nm (Figura 2.16b), si bien la polidispersidad en cuanto a forma

y tamaño es mucho mayor que en los procesos sintéticos habituales con razón molar $R=2$. Al incrementar la razón molar entre ácido oleico y $\text{Fe}(\text{acac})_3$ a $R=2.5$ y $R=3.5$ en ambos casos se obtienen buenas MNPs de forma cúbica, de tamaños 54.0 ± 7.0 nm y 66.1 ± 6.2 nm, respectivamente; si aumentamos a $R=4$ las MNPs pasan a adquirir en su mayoría forma cubooctaédrica con un tamaño de 55.3 ± 8.1 nm, si bien en las imágenes también se observa una cierta población de MNPs de forma cúbica (Figura 2.16c-e). Finalmente, cuando $R=5$ se obtienen cubooctaedros más monodispersos y de menor tamaño, 43.2 ± 6.2 nm (Figura 2.16f) que en la síntesis a $R=4$.

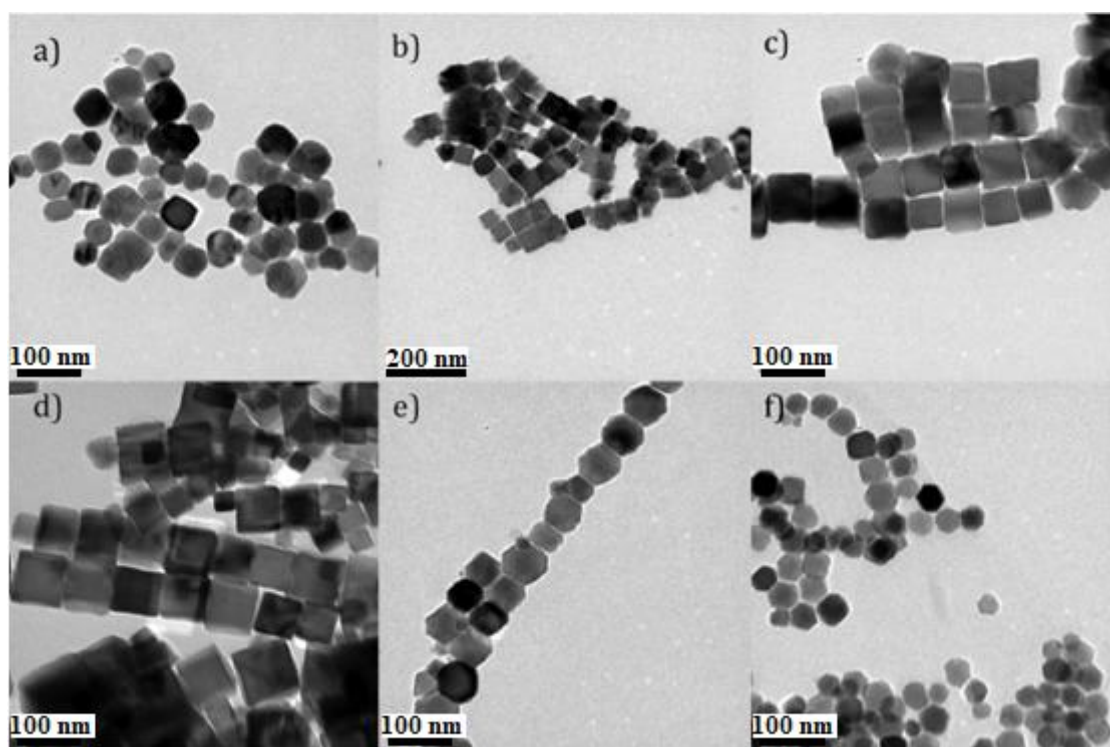


Figura 2.16: Imágenes de TEM de los sistemas de MNPs obtenidos con razones entre ácido oleico y precursor ferroso de a) $R = 1.5$, b) $R = 1.75$, c) $R = 2.5$, d) $R = 3.5$, e) $R = 4$ y f) $R = 5$.

En resumen, en las modificaciones de la síntesis típica efectuadas hasta el momento se han logrado MNPs de forma cúbica de diferentes tamaños variando la concentración de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en la disolución precursora, la razón de este con el ácido oleico, la velocidad de calentamiento, el tiempo y la temperatura de reacción del proceso sintético. De entre todas estas modificaciones, las que se han mostrado como más eficaces de cara a la obtención de MNPs con forma cúbica bien definida y monodispersas para un amplio rango de tamaños han sido las variaciones del tiempo de

reacción y, especialmente, de la concentración de precursor ferroso. La alteración de este último parámetro permite, dentro del rango estudiado, obtener nanocubos con tamaños de arista desde aproximadamente 28 nm hasta casi 100 nm. Las modificaciones de las demás variables estudiadas dan lugar, en varias ocasiones, a MNPs cúbicas muy polidispersas, con importantes grados de agregación e incluso, en algunos casos, a procesos sintéticos de bajo rendimiento. Por otra parte, en algunas de las síntesis ensayadas se consiguieron MNPs con diferente morfología a la cúbica habitual; así, la aplicación de una rampa de calentamiento de $16\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta la temperatura de reflujo permitió la obtención de MNPs con forma octaédrica, mientras que la implementación de razones molares entre agente estabilizante y precursor ferroso de $R=4$ y, principalmente, de $R=5$ dio lugar a la formación de MNPs que presentaban predominantemente morfologías cubooctaédricas.

2.2.1.5. Influencia del dopaje

En todos los ensayos realizados previamente se ha utilizado como único precursor magnético el $\text{Fe}(\text{acac})_3$, lo cual dio lugar a MNPs de óxido de hierro, concretamente de magnetita (Fe_3O_4), tal y como comprobamos a través de las medidas de difracción de rayos X. Para variar la composición de las partículas resultantes es necesario introducir otros compuestos precursores. A fin de reemplazar parte del hierro presente en las MNPs obtenidas tras los procesos sintéticos por elementos dopantes como cobalto, manganeso o zinc, se han efectuado pruebas de sustitución parcial del $\text{Fe}(\text{acac})_3$ por los acetilacetatos de los elementos mencionados ($\text{Co}(\text{acac})_2$ y $\text{Mn}(\text{acac})_2$ y $\text{Zn}(\text{acac})_2$) en diferentes porcentajes. La introducción de elementos dopantes en la estructura de las nanoestructuras permite la modificación en un amplio espectro de las propiedades magnéticas de MNPs con similares tamaños y morfologías³⁰.

Se han intentado obtener MNPs de forma cúbica con diferentes dopados con unos tamaños aproximados de 30 y 40 nm. Con ese objetivo, y a partir de los resultados expuestos en páginas anteriores, se han llevado a cabo las variaciones adecuadas de la denominada síntesis típica. Para obtener nanocubos de aproximadamente 40 nm se usó una concentración de precursores magnéticos de 100 mM (2.00 mmol de precursores

metálicos en 20 ml de éter bencílico), y para los nanocubos de aproximadamente 30 nm se empleó una concentración de 71 mM (1.42 mmol de precursores metálicos en 20 ml de éter bencílico). Se mantuvo en todos los casos la razón molar $R=2$ entre la cantidad total de precursores magnéticos y la cantidad de agente estabilizante (ácido oleico), a fin de lograr MNPs con una morfología cúbica bien definida. En la Tabla 2.4 se exponen las cantidades de los diferentes precursores magnéticos empleadas en las distintas síntesis efectuadas procurando nanocubos con una longitud de arista de 40 nm, así como el tamaño de las MNPs que finalmente se consiguieron y las composiciones de las mismas determinadas mediante ICP-MS. Por su parte, en las Figuras 2.17, 2.18 y 2.19 se muestran las imágenes de TEM de los distintos sistemas de MNPs cúbicas de aproximadamente 40 nm de tamaño dopadas con cobalto, manganeso y zinc, respectivamente.

Tabla 2.4: Cantidades de precursores magnéticos empleadas, tamaño y composición de los nanocubos de ca. 40 nm.

Fe(acac)₃ [mmol]	Zn(acac)₂ [mmol]	Co(acac)₂ [mmol]	Mn(acac)₂ [mmol]	Composición ICP-MS	Tamaño [nm]
1.75	-	0.25	-	Co _{0.17} Fe _{2.83} O ₄	40.6 ± 2.6
1.50	-	0.50	-	Co _{0.33} Fe _{2.67} O ₄	40.7 ± 2.7
1.10	-	0.90	-	Co _{0.71} Fe _{2.29} O ₄	41.3 ± 2.7
0.85	-	1.15	-	Co _{0.78} Fe _{2.22} O ₄	45.7 ± 4.3
1.85	0.15	-	-	Zn _{0.21} Fe _{2.79} O ₄	39.3 ± 2.4
1.82	0.18	-	-	Zn _{0.28} Fe _{2.72} O ₄	43.8 ± 3.4
1.60	0.40	-	-	Zn _{0.38} Fe _{2.62} O ₄	43.0 ± 3.6
1.35	0.65	-	-	Zn _{0.43} Fe _{2.57} O ₄	40.2 ± 3.0
0.71	1.29	-	-	Zn _{0.30} Fe _{2.70} O ₄	40.9 ± 3.3
0.50	1.50	-	-	Zn _{0.58} Fe _{2.42} O ₄	41.3 ± 3.0
1.82	-	-	0.18	Mn _{0.04} Fe _{2.96} O ₄	45.7 ± 4.4
1.60	-	-	0.40	Mn _{0.05} Fe _{2.95} O ₄	28.0 ± 3.1
1.33	-	-	0.67	Mn _{0.02} Fe _{2.98} O ₄	<<

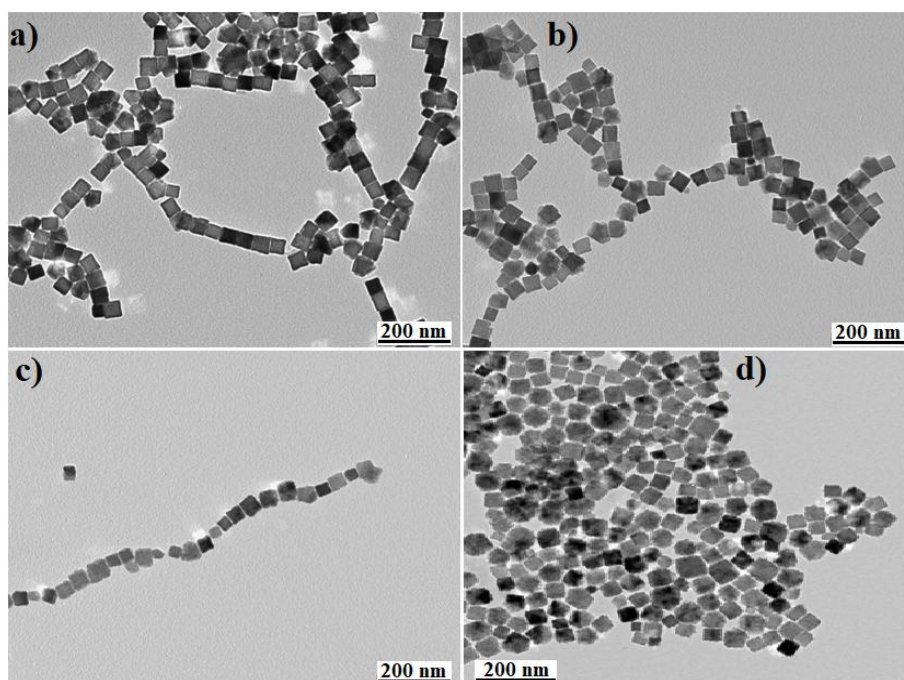


Figura 2.17: Imágenes TEM de los nanocubos de ca. 40 nm de composición: a) $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, b) $\text{Co}_{0.33}\text{Fe}_{2.67}\text{O}_4$, c) $\text{Co}_{0.71}\text{Fe}_{2.29}\text{O}_4$ y d) $\text{Co}_{0.78}\text{Fe}_{2.22}\text{O}_4$.

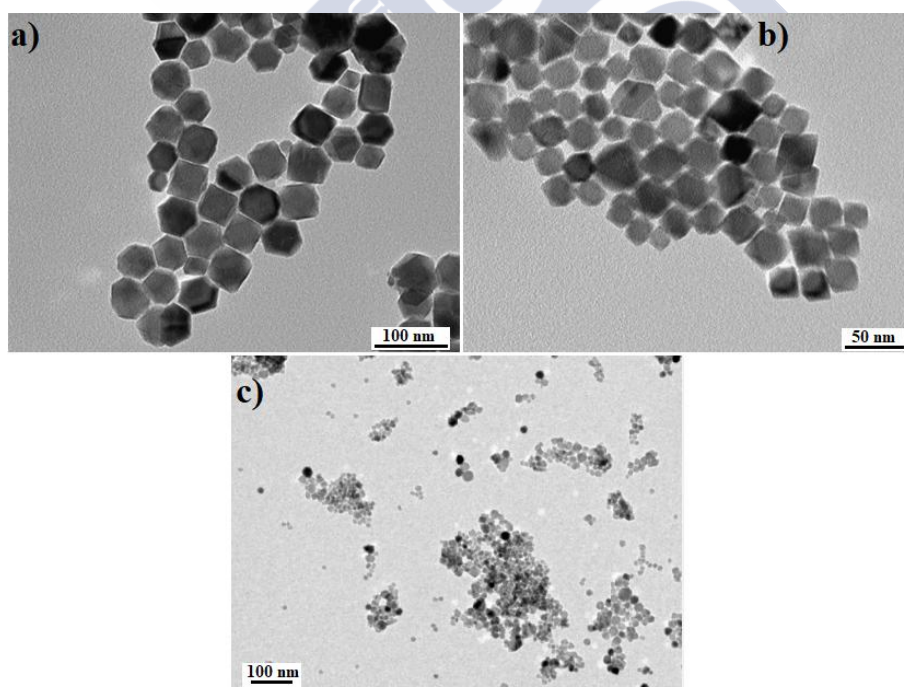


Figura 2.18: Imágenes TEM de los nanocubos de ca. 40 nm de composición: a) $\text{Mn}_{0.04}\text{Fe}_{2.96}\text{O}_4$, b) $\text{Mn}_{0.05}\text{Fe}_{2.95}\text{O}_4$ y c) $\text{Mn}_{0.02}\text{Fe}_{2.98}\text{O}_4$.

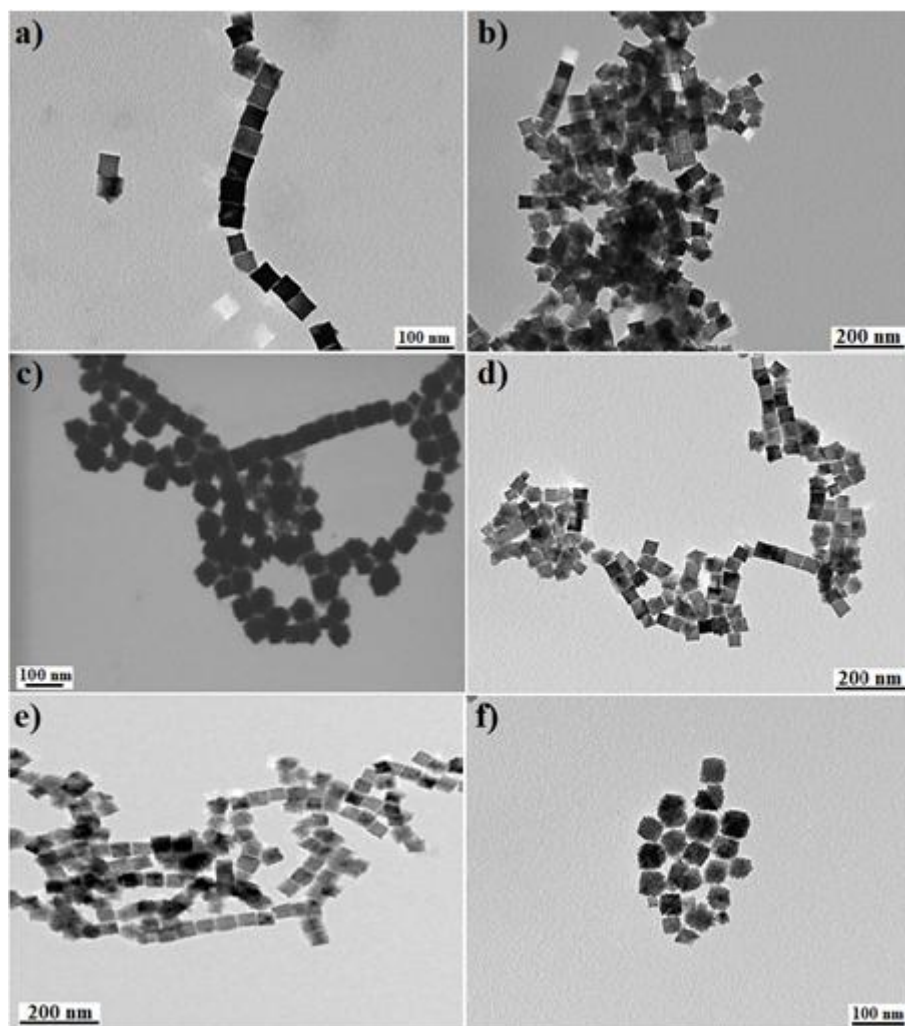


Figura 2.19: Imágenes TEM de los nanocubos de ca. 40 nm de composición: a) $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$, b) $\text{Zn}_{0.28}\text{Fe}_{2.72}\text{O}_4$, c) $\text{Zn}_{0.38}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, d) $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$, e) $\text{Zn}_{0.30}\text{Fe}_{2.70}\text{O}_4$ y f) $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$.

En la Tabla 2.5, por su parte, se muestran las cantidades de precursores magnéticos de hierro, manganeso, cobalto y zinc empleadas en las diferentes síntesis efectuadas para la obtención de nanocubos de aproximadamente 30 nm de longitud de arista, así como el tamaño concreto y la composición de los mismos determinada por ICP-MS. Las imágenes de TEM de estos sistemas magnéticos se pueden visualizar en la Figura 2.20

Tabla 2.5: Cantidades de precursores, tamaño y composición de los nanocubos de ca.30 nm.

Fe(acac) ₃ [mmol]	Zn(acac) ₂ [mmol]	Co(acac) ₂ [mmol]	Mn(acac) ₂ [mmol]	Composición ICP-MS	Tamaño [nm]
1.22	-	0.20	-	Co _{0.27} Fe _{2.73} O ₄	25.1± 1.8
0.95	-	0.47	-	Co _{0.72} Fe _{2.28} O ₄	30.1 ± 2.1
1.00	0.42	-	-	Zn _{0.10} Fe _{2.90} O ₄	27.1 ± 3.6
0.95	0.47	-	-	Zn _{0.12} Fe _{2.88} O ₄	30.9 ± 2.0
0.86	0.56	-	-	Zn _{0.28} Fe _{2.72} O ₄	33.4 ± 3.8
0.71	0.71	-	-	Zn _{0.31} Fe _{2.69} O ₄	31.4 ± 3.0

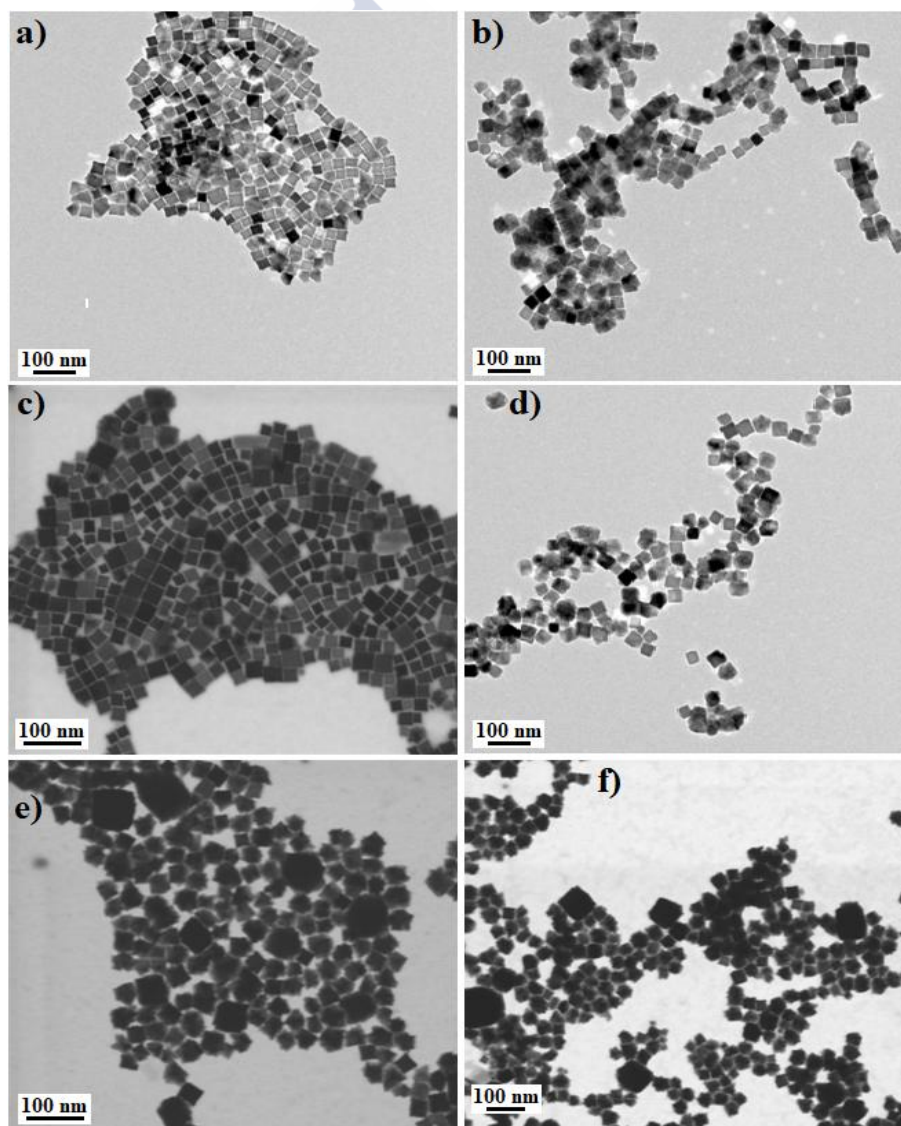


Figura 2.20: Imágenes TEM de nanocubos de ca. 30 nm de composición: a) Co_{0.27}Fe_{2.73}O₄, b) Co_{0.72}Fe_{2.28}O₄, c) Zn_{0.10}Fe_{2.90}O₄, d) Zn_{0.12}Fe_{2.88}O₄, e) Zn_{0.28}Fe_{2.72}O₄ y f) Zn_{0.31}Fe_{2.69}O₄.

Como se puede observar en las Figuras anteriores, una amplia mayoría de las síntesis efectuadas incluyendo los distintos elementos dopantes dan lugar a MNPs con una buena morfología cúbica y con tamaños próximos a los esperados dada la concentración de precursores magnéticos utilizada. El principal problema sucede al intentar incorporar el manganeso como elemento dopante. A este respecto, se llevaron a cabo tres ensayos diferentes (Figura 2.18) y, en ellos, se ha observado que únicamente introduciendo una cantidad de precursor de manganeso muy baja las MNPs conservan aproximadamente la forma y tamaño esperados; por el contrario, si se incrementa la cantidad de dicho precursor aumentan las alteraciones en las morfologías y tamaños deseados e, incluso, aparecen importantes problemas de agregación, tal y como se puede ver de forma clara en la Figura 2.18c. Por este motivo, el dopado con manganeso sólo fue realizado para la obtención de nanocubos de ca. 40 nm, no efectuándose ya ensayos de cara a su inclusión en nanocubos de ca. 30 nm.

En lo referente a los dopajes con cobalto y zinc, las MNPs obtenidas presentan todas las características deseadas, no alejándose en ningún caso más de 4 ó 5 nm del tamaño objetivo que se pretendía. Tan sólo en aquellas síntesis en las que se incluyó un porcentaje de elementos dopantes más elevados, dando lugar a partículas con estequiometrias $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{0.78}\text{Fe}_{2.22}\text{O}_4$ (Figuras 2.17d y 2.18f) los nanocubos no están perfectamente definidos a nivel morfológico y presentan unas aristas ligeramente rugosas, mientras que en algunos de los sistemas de MNPs también puede observarse cierta polidispersidad.

Respecto al grado de incorporación de los elementos dopantes, determinado mediante ICP-MS, también se observan importantes diferencias entre los tres elementos dopantes estudiados. Las MNPs dopadas con manganeso, como explicamos anteriormente, sólo aceptan un porcentaje muy bajo de sustitución del $\text{Fe}(\text{acac})_3$ por $\text{Mn}(\text{acac})_2$ sin que aparezcan problemas de pérdida del tamaño y la morfología deseados. Además, la incorporación real de este elemento dopante a la estructura de las MNPs es mucho menor de la que cabría esperar. Por ejemplo, en la síntesis efectuada con la cantidad de $\text{Mn}(\text{acac})_2$ más pequeña, la única que dio lugar a MNPs de tamaño y morfología semejantes a los pretendidos, el porcentaje de incorporación del manganeso a las MNPs es de apenas un 14%. A medida que aumentamos la cantidad del precursor de manganeso las MNPs pierden progresivamente las características deseadas y, además, el grado de incorporación del elemento dopante en la estructura de los sistemas

decae casi a cero. Por su parte, como ya mencionamos también con anterioridad, la sustitución parcial del precursor de hierro por los de cobalto y zinc no da lugar a alteraciones significativas respecto a las características morfológicas de las MNPs. El grado de incorporación de estos elementos dopantes a la estructura de las MNPs se representa gráficamente en la Figura 2.21, donde las líneas azules marcan el porcentaje de incorporación del 100%.

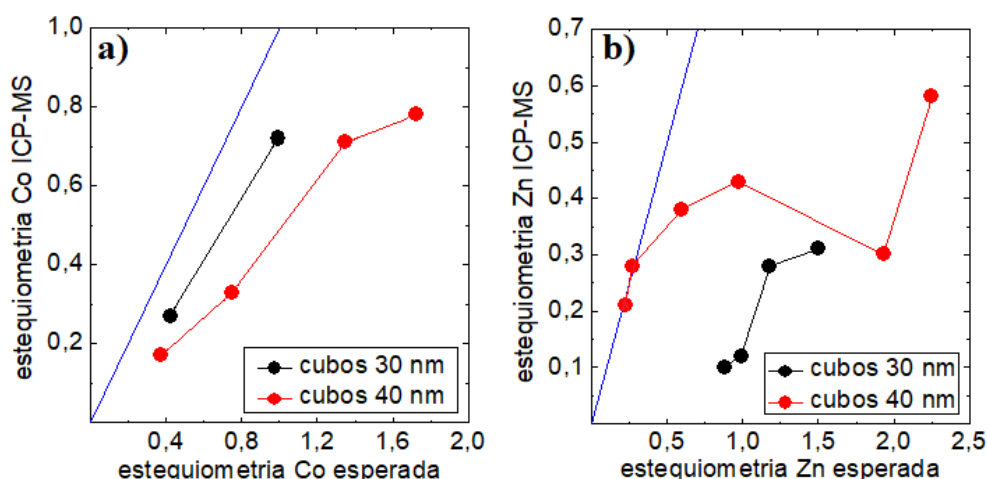


Figura 2.21: Estequiometrías de los elementos dopantes a) cobalto y b) zinc en los nanocubos, determinadas por ICP-MS, frente a las estequiometrías esperadas dadas las razones entre precursores magnéticos (las líneas azules marcan la incorporación total).

Se puede observar que, en el caso del cobalto, este se incorpora de forma consistente a las NPs independientemente de si el grado de dopaje de los mismos es bajo o elevado, con un comportamiento aproximadamente lineal en la representación gráfica de la estequiometría obtenida frente a la esperada. El porcentaje de incorporación del cobalto es ligeramente superior en el caso de los nanocubos de 30 nm, siendo de más de un 65% en estos mientras que en los de 40 nm alcanza aproximadamente el 50%. El comportamiento del zinc como agente dopante, por su parte, no sigue un comportamiento tan bien definido como el del cobalto. En los nanocubos de 40 nm, a los dos grados de sustitución más bajos ensayados, la incorporación del zinc a la estructura de los sistemas es prácticamente del 100%, decayendo posteriormente a medida que se aumenta la cantidad del precursor de zinc empleada hasta porcentajes cercanos al 25%. En los nanocubos de 30 nm, sin embargo, el zinc se incorpora de forma similar tanto a bajos como a altos grados de sustitución,

pero en todos los casos en un bajo porcentaje, inferior en promedio al 20%. Los porcentajes promedios de incorporación de los tres elementos dopantes ensayados se muestran en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6: Porcentajes de incorporación promedios de cobalto, zinc y manganeso a la estructura de los nanocubos en las síntesis efectuadas.

Dopaje	% incorporación
Co	(54.0 \pm 9.5)
Zn	(40 \pm 18)
Mn	(8.3 \pm 4.2)

De este modo, se observa que, como tendencia general, los elementos dopantes ensayados que se incorporan en las posiciones octaédricas de la estructura de espinela de las MNPs (cobalto) lo hacen en un porcentaje superior a los que se incorporan en las posiciones tetraédricas (zinc) o de forma mixta (manganeso). Este comportamiento guarda cierta correspondencia con el mayor número de posiciones octaédricas existentes en las estructuras de espinela, que doblan al número de posiciones tetraédricas³⁵. Por su parte, la muy baja incorporación del manganeso en comparación con la del zinc puede atribuirse a la importante diferencia entre los tamaños atómicos de estos elementos, mucho más elevado en el caso del manganeso, que presumiblemente puede dar lugar a que este último elemento tenga más dificultad para posicionarse en la estructura de espinela de las ferritas sustituyendo a los átomos de hierro sin romper la simetría de coordinación de la red cristalina³⁶.

Una tendencia observada tanto en los dopajes con zinc como, en menor medida, en los de cobalto, es el mayor porcentaje de incorporación del dopante cuando el grado de sustitución del precursor férrico es reducido. Este comportamiento es indicativo de que en la estructura de las MNPs dopadas se produce un fenómeno de saturación por el cual a medida que se incrementa el grado de dopaje mayor debe ser el exceso del precursor dopante que se utilice. Esta tendencia se observa de forma evidente en los nanocubos de 40 nm dopados con zinc: cuando la cantidad de zinc añadida es baja este se incorpora a la estructura de las MNPs prácticamente en su totalidad (> 95%); a

medida que se aumenta el grado de sustitución del precursor ferroso por el de zinc el porcentaje de incorporación de este va decayendo hasta el 25% observado en el último ensayo efectuado, donde la estequiometría de las MNPs sintetizadas fue $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$. Dado que en esta última síntesis ya se sustituyó un muy alto porcentaje del precursor ferroso por precursor de zinc, esto parece indicar que la cantidad de zinc más elevada que se puede incorporar a los nanocubos por este método no es excesivamente superior a la antes mencionada. Recuérdese además que, a los grados de sustitución más altos, las MNPs comenzaban a mostrar una cierta pérdida de la morfología cúbica deseada. Este mismo comportamiento, si bien de forma mucho más sutil, también se observa en los nanocubos de 40 nm dopados con cobalto. En este caso, aunque el porcentaje de incorporación se mantiene bastante estable en los distintos sistemas sintetizados, la tendencia general muestra un cierto decrecimiento del mismo a medida que aumenta el grado de sustitución del precursor ferroso.

Por otra parte, resulta más complejo explicar las diferencias observadas en los dopajes entre los nanocubos de 30 nm y los de 40 nm. En el caso de los sistemas dopados con cobalto, su porcentaje de incorporación es mayor en los nanocubos de menor tamaño, pasando de un 50% a un 65%. Esta diferencia, aunque importante, puede ser justificada en base al escaso muestreo de sistemas dopados con cobalto de 30 nm y, fundamentalmente, a las bajas cantidades del precursor de cobalto empleadas en estos. Por ello, en base a lo comentado previamente, sería esperable una ligera disminución del porcentaje promedio de incorporación de haber efectuado síntesis con una mayor cantidad de precursor de cobalto. Se podría, por tanto, considerar que el comportamiento del cobalto como elemento dopante sería bastante similar en los nanocubos de los dos tamaños ensayados. Por el contrario, en los sistemas dopados con zinc el porcentaje de incorporación del dopante, al contrario que en los dopajes con cobalto, es mucho menor en los nanocubos de 30 nm que en los de 40 nm, pasando de un promedio de aproximadamente un 50% a uno del 17%. Si en vez de los valores promedios se comparan MNPs de ambos tamaños obtenidas bajo cantidades de precursor ferroso y de zinc similares las diferencias entre los porcentajes de incorporación de este último elemento decaen levemente, pero siguen siendo importantes. Una posible justificación a esta observación se puede encontrar en las características de los átomos de zinc que, a pesar de tener un tamaño inferior al de los átomos de hierro, presentan un peso atómico muy superior³⁶. De este modo, resulta

posible que en los nanocubos de 30 nm, con una estructura volumétrica más reducida que la de los de 40 nm y, por tanto, con menos posiciones tetraédricas, los átomos de zinc tengan más dificultades para incorporarse sin causar defectos en la estructura de espinela de las MNPs. Asimismo, la baja concentración de las disoluciones precursoras utilizadas para sintetizar los nanocubos de 30 nm puede derivar en pequeños problemas de difusión del precursor de zinc que impidan su correcta incorporación a la estructura de las MNPs. Así, se trata de dos suposiciones que *a priori* permitirían explicar los resultados obtenidos, pero que no justifican en su totalidad la diferencia tan elevada observada entre los porcentajes de incorporación del elemento dopante en las estructuras a los dos tamaños de partícula ensayados, por lo que esta cuestión debe de ser estudiada en mayor profundidad.

Tras sintetizar los distintos sistemas de nanocubos con tamaños de arista de ca. 30 y 40 nm y analizar el porcentaje de incorporación de los elementos dopantes ensayados en los mismos, es importante a continuación determinar si las MNPs mantienen la estructura cristalina que presentaban en ausencia de elementos dopantes. Es necesario recordar que los nanocubos de óxido de hierro resultantes de la llamada síntesis típica, preparados empleando $\text{Fe}(\text{acac})_3$ como único elemento precursor magnético y con un tamaño de arista de aproximadamente 50 nm, fueron caracterizados estructuralmente con anterioridad mediante XRD, SAED y HRTEM, tras lo que se concluyó que la fase cristalina predominante en las MNPs es Fe_3O_4 (magnetita). Por ello, el siguiente paso consistió en comprobar, en este caso solo mediante medidas de XRD, si esta estructura se mantiene al incluir los distintos elementos dopantes. Así, se estudiaron, a modo de ejemplo, dos sistemas de nanocubos de 30 nm de tamaño y dos de 40 nm, dopados, en cada caso, uno con zinc y otro con cobalto, respectivamente. Se escogieron, en general, grados de dopajes elevados con los elementos correspondientes, para así comprobar si la inclusión de importantes cantidades de zinc o cobalto afecta a la estructura de las NPs. Asimismo, también se estudiaron mediante XRD los nanocubos con tamaños de arista de 30 y 40 nm sin dopaje para, de esta forma, comprobar si la modificación del tamaño de las MNPs, manteniendo invariable su composición, afecta de alguna forma a su estructura cristalina. En la Figura 2.22 se pueden ver los difractogramas de rayos X de las seis muestras estudiadas.

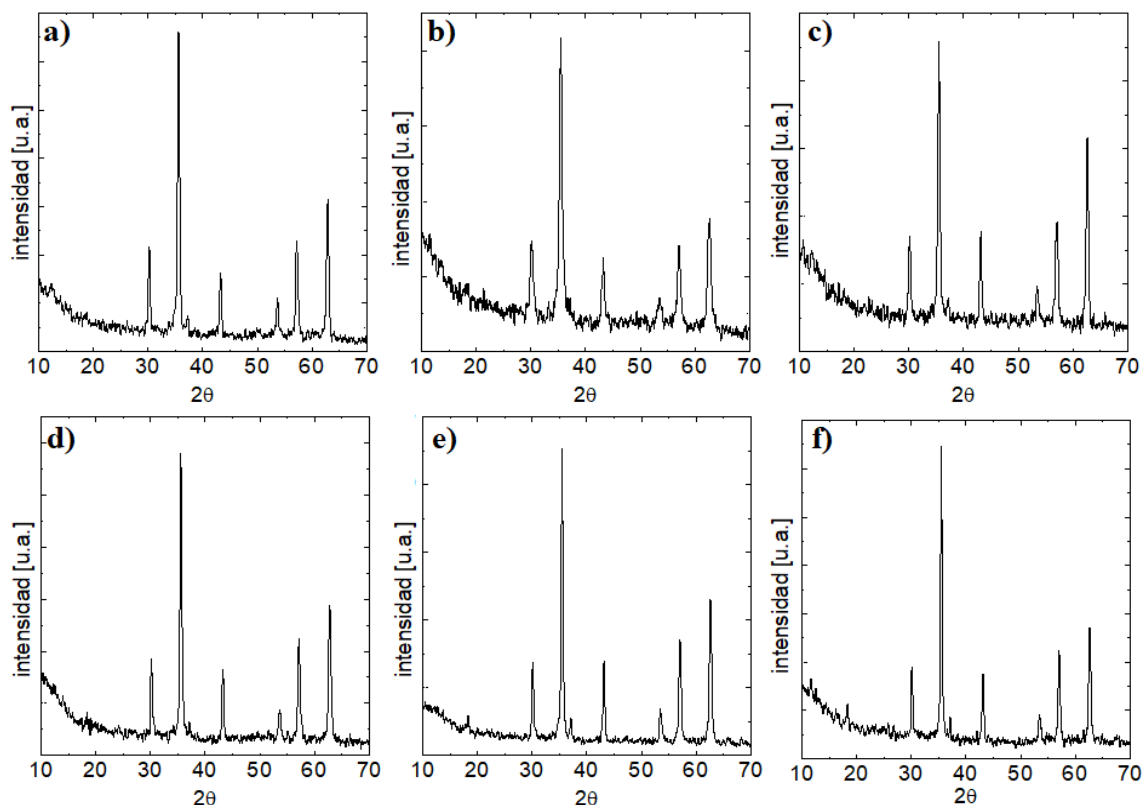


Figura 2.22: Difractogramas de rayos X de los nanocubos de 30 nm de composición: a) Fe_3O_4 , b) $\text{Zn}_{0.28}\text{Fe}_{2.72}\text{O}_4$ y c) $\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$; y de los nanocubos de 40 nm de composición: d) Fe_3O_4 , e) $\text{Zn}_{0.18}\text{Fe}_{2.82}\text{O}_4$ y f) $\text{Co}_{0.71}\text{Fe}_{2.29}\text{O}_4$.

Se observa que los espectros de difracción de rayos X de los diferentes nanocubos estudiados son muy similares entre sí, con los picos característicos en posiciones prácticamente idénticas. Además, dichas posiciones se corresponden, a su vez y de forma casi exacta, con las determinadas teóricamente para la estructura de espinela de la magnetita (Figura 2.4b), al igual que sucedía en los nanocubos de óxido de hierro resultantes de la síntesis típica²¹. De este modo, se puede concluir que tanto la modificación del tamaño de los nanocubos como los dopajes con cobalto o zinc no afectan a la estructura cristalina de las MNPs. Estos últimos elementos se disponen, según corresponda, en las posiciones tetraédricas y octaédricas de la estructura de espinela de la magnetita sustituyendo a los átomos de hierro, pero sin variar la cristalinidad de las MNPs. Tal y como se explicó previamente en el análisis estructural de los nanocubos resultantes de la síntesis típica, los difractogramas obtenidos dejan cabida a que la estructura cristalina de las MNPs sea maghemita, dado que los picos característicos de mayor intensidad de esta última y de la magnetita son prácticamente

coincidentes. Sin embargo, la ausencia de los picos menores característicos de la maghemita y el reconocimiento automático de los espectros obtenidos, efectuado por el difractómetro utilizado, confirmaron la magnetita como la fase cristalina predominante en todos los sistemas.

2.2.2. Transferencia a medio acuoso y estabilidad de las MNPs de forma cúbica

Tal y como fue comentado en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, el gran inconveniente que presenta la técnica sintética de la descomposición térmica es que dar lugar a MNPs que no son directamente solubles en medio acuoso¹⁴. El recubrimiento de ácido oleico que presentan los diferentes nanocubos al finalizar la reacción de síntesis hace que estos sólo sean estables en disolventes de baja polaridad como, por ejemplo, hexano o cloroformo. La transferencia de los sistemas de NPs a medio acuoso se llevó a cabo mediante dos métodos alternativos: un proceso de recubrimiento polimérico, utilizando para tal fin el polímero PMA modificado con dodecilamina en un 75% y un proceso de intercambio de ligando empleando DMSA, siguiendo en ambos casos los protocolos ya explicados en la sección de Materiales y Métodos.

2.2.2.1. Estudio de las MNPs transferidas a medio acuoso por recubrimiento polimérico mediante medidas de TEM y DLS

En función de los tamaños de las MNPs cúbicas, se determinó experimentalmente la densidad superficial de monómeros de PMA que era necesario implementar para que las MNPs pasasen a ser estables en medio acuoso (Tabla 2.1). Así, variando esta cantidad desde 5000 hasta 9000 monómeros·nm⁻² se consiguieron estabilizar nanocubos entre 30 y 50 nm de longitud de arista. Tras efectuar los recubrimientos poliméricos las MNPs cúbicas fueron redispersadas en agua miliQ.

Tras transferir los sistemas con los diferentes dopajes implementados a medio acuoso, la estabilidad y ausencia de agregación de las MNPs fue evaluada a través de distintas técnicas. En primer lugar, se estudió, a modo de ejemplo, el sistema de nanocubos de ca. 30 nm y composición Zn_{0.12}Fe_{2.88}O₄ mediante TEM, a fin de constatar

que el proceso de recubrimiento polimérico no daba lugar a fenómenos de agregación de las MNPs. En la Figura 2.23 se puede observar que las MNPs conservan sus formas y tamaños originales, así como un índice de aglomeración reducido, similar al que presentaban antes de efectuar el recubrimiento polimérico.

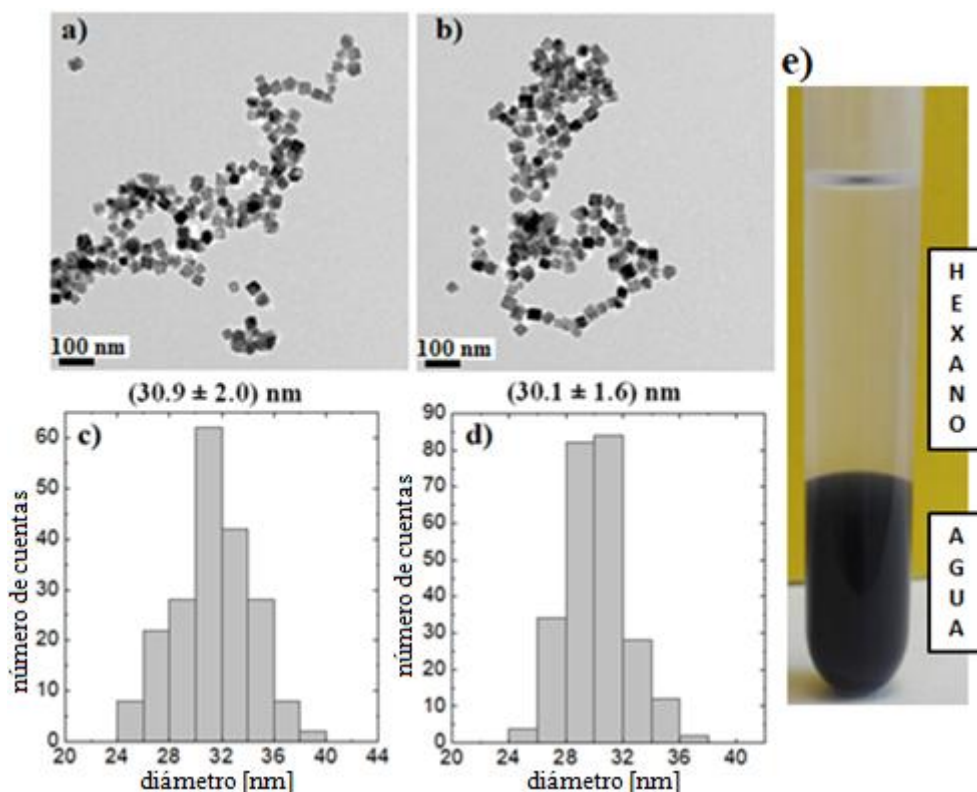


Figura 2.23: Imágenes TEM e histogramas de las distribuciones estadísticas de tamaños de los nanocubos de composición $\text{Zn}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$ a) y c) antes, y b) y d) después del proceso de transferencia a medio acuoso mediante la técnica de recubrimiento polimérico; e) fotografía de los nanocubos en un tubo de ensayo con agua y hexano tras ser funcionalizados.

Tras un período de incubación en medio acuoso de aproximadamente una semana se observó que las diferentes MNPs presentaban, en menor o mayor medida, pequeñas cantidades de material precipitado en el fondo de los recipientes que contenían las disoluciones. Este fenómeno, si bien no deseable, no es necesariamente sintomático de un incorrecto proceso de recubrimiento polimérico. Nótese que dados los tamaños de las MNPs estudiadas, estas deben presentar, en principio, un comportamiento ferrimagnético débil³⁷, el cual da lugar a la aparición de fuerzas de atracción de carácter dipolar entre las mismas que pueden derivar en la formación de pequeños agregados que reducen la estabilidad coloidal de las MNPs. El recubrimiento polimérico individual de

cada partícula, aunque mitiga en gran medida este fenómeno, no es suficiente para neutralizar completamente estas interacciones. No obstante, las partículas se redispersan fácilmente de nuevo mediante una breve agitación manual, tras la cual los sistemas recuperan su estabilidad en medio acuoso, de modo que tan sólo vuelven a producirse pequeños fenómenos de sedimentación transcurridos varios días.

De cara a evaluar de forma cuantitativa el grado de agregación y monodispersidad, en todos los nanocubos de ca. 30 y 40 nm transferidos a medio acuoso se midió el tamaño hidrodinámico como magnitud característica de la estabilidad de los nanosistemas, obteniéndose las distribuciones estadísticas que se muestran en las Figuras 2.24, 2.25 y 2.26 (tres medidas para cada muestra), con los valores promedio indicados en la Tabla 2.7.

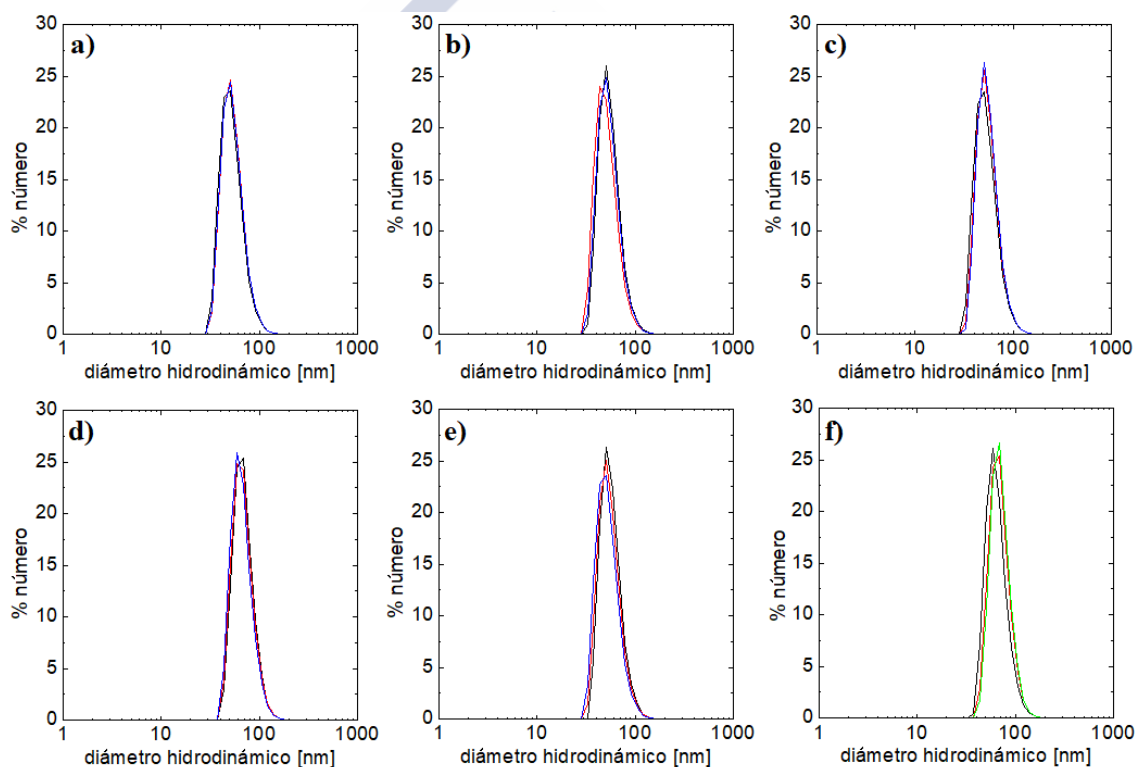


Figura 2.24: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de ca. 40 nm con las siguientes composiciones: a) $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, b) $\text{Co}_{0.33}\text{Fe}_{2.67}\text{O}_4$, c) $\text{Co}_{0.71}\text{Fe}_{2.29}\text{O}_4$, d) $\text{Co}_{0.78}\text{Fe}_{2.22}\text{O}_4$, e) $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ y f) $\text{Zn}_{0.28}\text{Fe}_{2.72}\text{O}_4$.

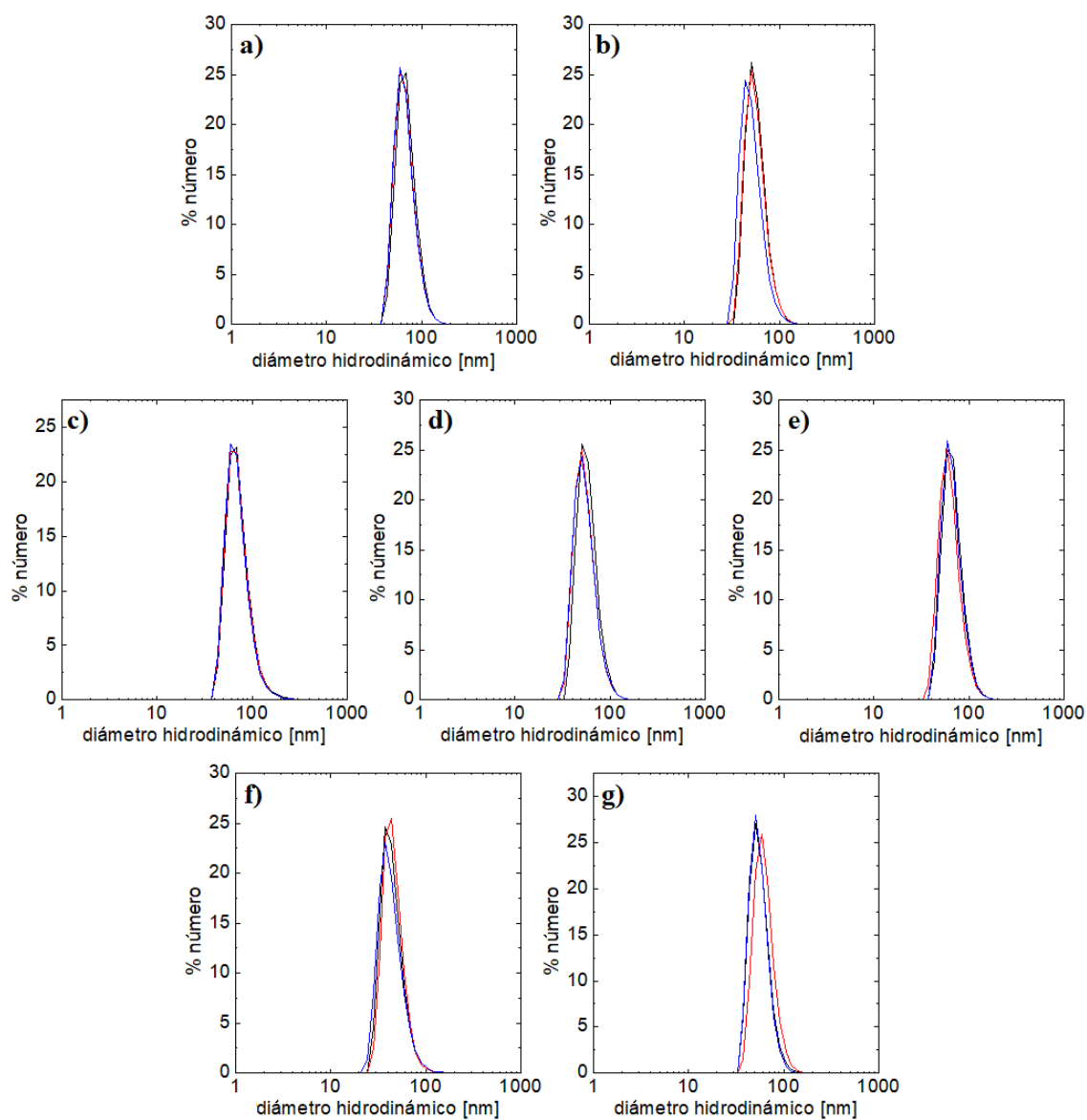


Figura 2.25: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de ca. 40 nm con las siguientes composiciones: a) $\text{Zn}_{0.38}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, b) $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$, c) $\text{Zn}_{0.30}\text{Fe}_{2.70}\text{O}_4$, d) $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, e) $\text{Mn}_{0.04}\text{Fe}_{2.96}\text{O}_4$, f) $\text{Mn}_{0.05}\text{Fe}_{2.95}\text{O}_4$ y g) Fe_3O_4 .

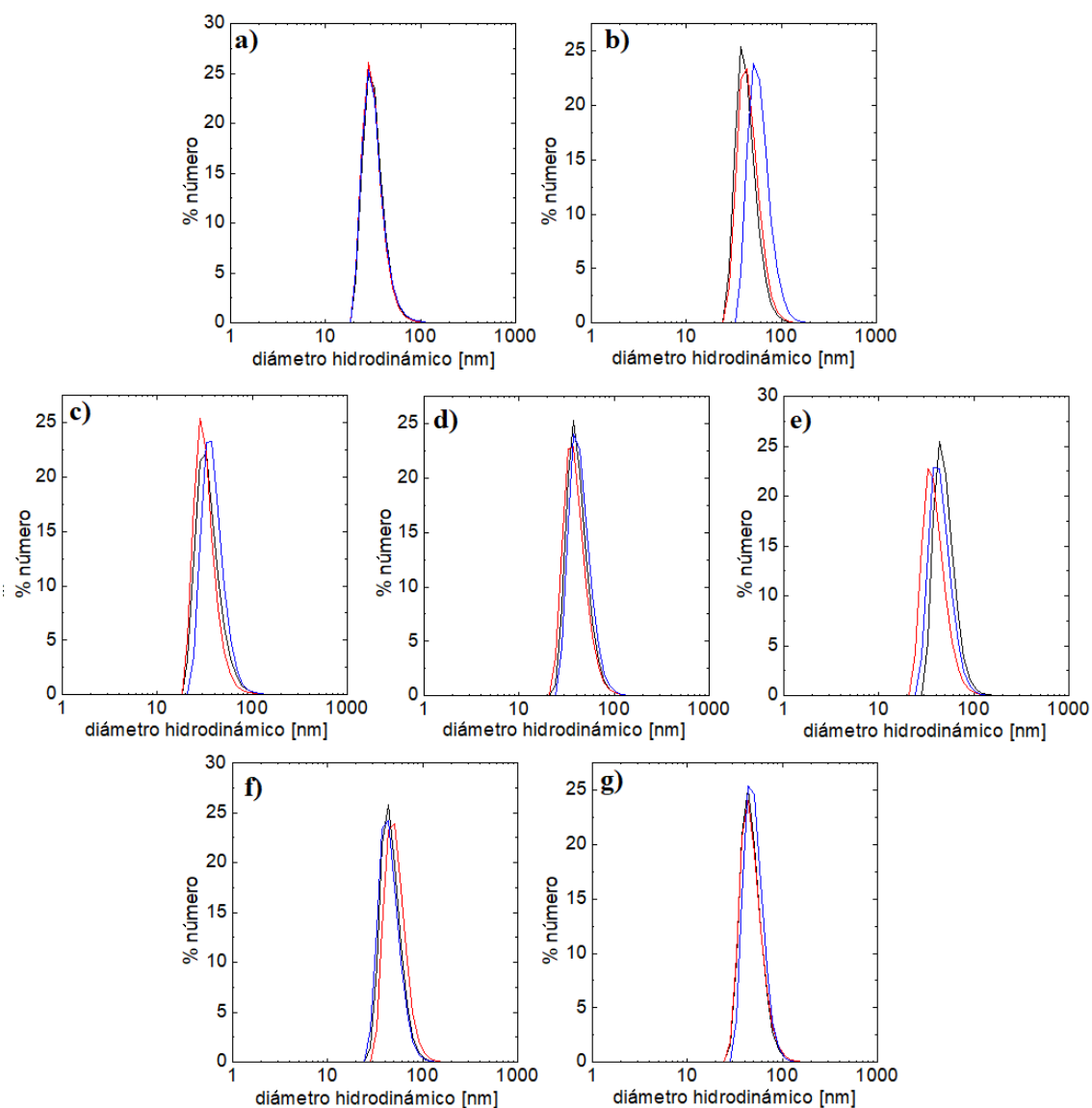


Figura 2.26: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de ca. 30 nm con las siguientes composiciones: a) $\text{Co}_{0.27}\text{Fe}_{2.73}\text{O}_4$, b) $\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, c) $\text{Zn}_{0.10}\text{Fe}_{2.90}\text{O}_4$, d) $\text{Zn}_{0.12}\text{Fe}_{2.98}\text{O}_4$, e) $\text{Zn}_{0.28}\text{Fe}_{2.72}\text{O}_4$, f) $\text{Zn}_{0.31}\text{Fe}_{2.69}\text{O}_4$ y g) Fe_3O_4 .

Tabla 2.7: Valores promedio de los tamaños hidrodinámicos de los diferentes nanocubos obtenidos.

	Composición ICP-MS	Tamaño TEM (fase orgánica) [nm]	Diámetro hidrodinámico (fase acuosa) [nm]
ca. 40 nm	Fe ₃ O ₄	41.1 ± 3.1	59 ± 15
	Co _{0.17} Fe _{2.83} O ₄	40.6 ± 2.6	54 ± 14
	Co _{0.33} Fe _{2.67} O ₄	40.7 ± 2.7	55 ± 15
	Co _{0.71} Fe _{2.29} O ₄	41.3 ± 2.7	56 ± 13
	Co _{0.78} Fe _{2.22} O ₄	45.7 ± 4.3	69 ± 17
	Zn _{0.21} Fe _{2.79} O ₄	39.3 ± 2.4	56 ± 11
	Zn _{0.28} Fe _{2.72} O ₄	43.8 ± 3.4	64 ± 16
	Zn _{0.38} Fe _{2.62} O ₄	43.0 ± 3.6	66 ± 18
	Zn _{0.43} Fe _{2.57} O ₄	40.2 ± 3.0	58 ± 16
	Zn _{0.30} Fe _{2.70} O ₄	40.9 ± 3.3	73 ± 20
	Zn _{0.58} Fe _{2.42} O ₄	41.3 ± 3.0	60 ± 10
	Mn _{0.04} Fe _{2.96} O ₄	45.7 ± 4.4	67 ± 18
	Mn _{0.05} Fe _{2.95} O ₄	28.0 ± 3.1	45 ± 13
ca. 30 nm	Fe ₃ O ₄	33.3 ± 4.3	49 ± 13
	Co _{0.27} Fe _{2.73} O ₄	25.1 ± 1.8	33.1 ± 9.6
	Co _{0.72} Fe _{2.28} O ₄	30.1 ± 2.1	50 ± 14
	Zn _{0.10} Fe _{2.90} O ₄	27.1 ± 3.6	37 ± 12
	Zn _{0.12} Fe _{2.88} O ₄	30.9 ± 2.0	43 ± 13
	Zn _{0.28} Fe _{2.72} O ₄	33.4 ± 3.8	46 ± 16
	Zn _{0.31} Fe _{2.69} O ₄	31.4 ± 3.0	49 ± 11

Las distribuciones estadísticas de los tamaños hidrodinámicos de los diferentes nanocubos sintetizados presentan, todas ellas, un único pico. Estos picos están, además, bien definidos, presentando una anchura lo suficientemente reducida como para considerar las MNPs cúbicas muy monodispersas, con una sola población. Los valores promedios de los tamaños hidrodinámicos, por su parte, oscilan, como norma general, entre los 35 y 50 nm en los nanocubos con una longitud de arista medida en las imágenes de TEM de ca. 30 nm, y entre 55 y 70 nm en los que presentan una longitud

de arista de ca. 40 nm. Estos valores son completamente razonables si consideramos el tamaño de la parte inorgánica de las MNPs, observada mediante TEM, y el espesor del recubrimiento polimérico. Asimismo, debe considerarse que al encontrarse los nanocubos en disolución se produce un fenómeno de estiramiento de las cadenas hidrófilas del polímero que supone una contribución extra de varios nanómetros al tamaño hidrodinámico de las MNPs³⁸. Un último factor a considerar es que los equipos de DLS calculan los tamaños de las NPs a partir de las intensidades de los haces de luz dispersados por los sistemas basándose en la suposición de que las NPs son esféricas, empleando la ecuación de Stokes-Einstein³⁹. Por tanto, esta aproximación puede ocasionar que en casos como el presente, en el que se estudian sistemas de NPs con morfología cúbica, haya una ligera divergencia entre los tamaños. En definitiva, se puede concluir que los valores de los tamaños hidrodinámicos obtenidos y su diferencia con las longitudes de arista medidas en las imágenes de TEM son perfectamente consistentes con una ausencia total de agregación de los nanocubos tras efectuar el proceso de transferencia de fase.

2.2.2.2. Estudio de las MNPs transferidas a medio acuoso por recubrimiento polimérico mediante medidas de FTIR y determinación del potencial ζ

El correcto recubrimiento polimérico de los nanocubos funcionalizados con el complejo PMA-dodecilamina se corroboró mediante medidas de la movilidad electroforética de los mismos, a partir de las cuales se determinaron las distribuciones estadísticas de potencial ζ (Figura 2.27). Nótese que la alta estabilidad de los sistemas en medio acuoso demuestra que la transferencia de fase se llevó a cabo con éxito, pues de no haber sido así el recubrimiento original con ácido oleico, altamente hidrófobo, causaría la inmediata precipitación de las MNPs al ser redispersadas en un medio altamente polar como el agua. A modo de ejemplo, se constató la presencia de la capa polimérica y su uniformidad en dos sistemas de diferente tamaño: los nanocubos de ca. 30 nm de composición $\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, y los nanocubos de ca. 40 nm de composición $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$.

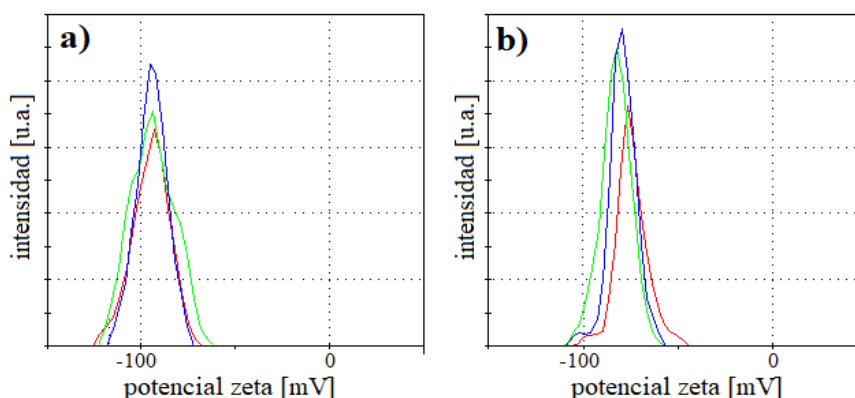


Figura 2.27: Distribuciones estadísticas del potencial ζ de los nanocubos de tamaño y composición a) ca. 40 nm y $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, y b) ca. 30 nm y $\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$.

Las distribuciones de potencial ζ de las dos MNPs estudiadas muestran un solo pico característico. Aunque presentan una anchura ligeramente superior a las de los picos de las distribuciones de tamaños medidas previamente mediante DLS, están lo suficientemente definidos como para considerar que el recubrimiento polimérico crecido sobre la superficie de las MNPs es uniforme en todas ellas. Los valores medios de la magnitud estudiada fueron -95.1 ± 9.6 mV en los nanocubos de 40 nm y composición $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$ y -78.1 ± 9.3 mV en los nanocubos de 30 nm y composición $\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, respectivamente. Los valores negativos del potencial ζ son esperados, pues al unirse el complejo PMA-dodecilamina a las cadenas hidrófobas que constituían el recubrimiento original de las MNPs los grupos funcionales que quedan expuestos en la superficie son grupos carboxilo, que presentan una carga negativa. Asimismo, resulta lógico que las MNPs de mayor tamaño presenten un valor absoluto de potencial ζ más elevado, dado que su mayor área superficial implica una mayor cantidad de cadenas poliméricas unidas a la misma, con el consecuente aumento de la carga neta negativa. Por su parte, los valores promedios de aproximadamente -80 mV y -95 mV en los nanocubos de 30 y 40 nm, respectivamente, están en consonancia con los previamente reportados en sistemas funcionalizados con compuestos similares, teniendo en cuenta las diferencias entre los tamaños de las MNPs sintetizadas^{40,41}.

Además, el sistema de nanocubos de ca. 40 nm de composición $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$ también fue caracterizado mediante FTIR (Figura 2.28). El espectro obtenido, al igual que los valores de potencial ζ previamente determinados, también confirma el correcto

recubrimiento de los sistemas con el complejo polimérico^{42,43}. Así, con respecto a las medidas efectuadas a los nanocubos recubiertos con ácido oleico, se mantienen la banda ancha centrada en ca. 3400 cm^{-1} asociada a las vibraciones de los enlaces O-H y las bandas situadas en 2920 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} debidas a las vibraciones de las terminaciones metilo y metileno. Asimismo, tal y como era de esperar, también se conserva la señal a 545 cm^{-1} asociada a la vibración de los enlaces Fe-O de la magnetita. Las nuevas señales que confirman el correcto recubrimiento de las MNPs con el polímero modificado son, fundamentalmente, la banda estrecha en 1600 cm^{-1} , que es debida a las vibraciones de los dobles enlaces C=O característicos de la estructura del polímero utilizado, y las pequeñas señales entre 1000 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} , asociadas a los estiramientos de los enlaces C-O simples. También aparecen dos pequeñas bandas a 1460 cm^{-1} y 1390 cm^{-1} , que se asocian a la deformación angular de las terminaciones CH_2 y CH_3 del polímero.

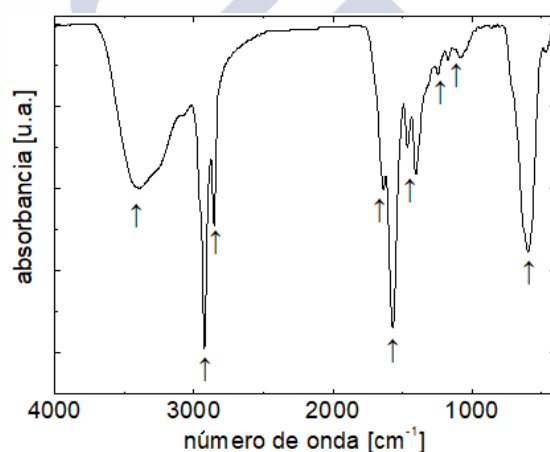


Figura 2.28: Espectro FTIR de los nanocubos de ca. 40 nm y composición $\text{Zn}_{0.58}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$ funcionalizados con el complejo PMA-dodecilamina.

En resumen, se han transferido a medio acuoso, mediante un proceso de recubrimiento polimérico, nanocubos con longitudes de arista de ca. 30 y 40 nm dopados en diferentes grados con zinc, cobalto y manganeso. Una vez efectuada dicha transferencia, se verificó la no agregación de las MNPs mediante imágenes de TEM y medidas del tamaño hidrodinámico, constatando además el correcto recubrimiento polimérico mediante medidas de potencial ζ y FTIR. Como se comentó previamente, las MNPs presentaban una alta estabilidad en agua, produciéndose solo pequeños

fenómenos de precipitación de las MNPs al cabo de varios días debido a las interacciones de carácter dipolar entre las mismas como consecuencia de su presumible comportamiento ferrimagnético.

2.2.2.3. Estudio de la estabilidad en medios biológicos de las MNPs transferidas a medio acuoso por recubrimiento polimérico

A continuación, se estudió la estabilidad de los nanocubos en diferentes medios biológicos, condición de gran importancia de cara a sus potenciales aplicaciones biomédicas⁴⁴. Para ello, se llevaron a cabo medidas de la variación del tamaño hidrodinámico de las MNPs cúbicas recubiertas con PMA-dodecilamina durante 96 h, tiempo suficiente para observar si los diferentes fluidos ocasionan, o no, fenómenos de agregación en los sistemas magnéticos obtenidos¹³. Se estudió, como prueba de concepto, sólo uno de los sistemas sintetizados, concretamente el de nanocubos con un tamaño de 40 nm de arista y composición $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$. Se escogió este tamaño de nanocubo porque, a priori, estos deben presentar mayores problemas de estabilidad que los de 30 nm, por lo que de concluir que el sistema analizado es estable esta condición debería cumplirse también en los nanocubos de menor tamaño. Por su parte, la elección de los nanocubos con el grado de dopaje antes indicado no responde a ningún criterio específico, dado que la estabilidad estará condicionada fundamentalmente por la densidad y, sobre todo, por el recubrimiento de las MNPs, muy similares en todos los sistemas sintetizados. Los medios biológicos en los que se ensayó la estabilidad de los nanocubos fueron: disolución salina tamponada con fosfato (PBS), para simular las condiciones de osmolaridad y concentración iónica existentes en el fluido extracelular humano; disoluciones de cloruro de sodio (NaCl) en agua en el rango de concentraciones de 0.02 M a 2.50 M, para simular las variadas condiciones de salinidad presentes en las distintas zonas del cuerpo humano; medio fagolisosomal (PSF), disolución que simula las condiciones del interior de los fagolisomas que se forman cuando las partículas penetran en el interior celular a través de un proceso de fagocitosis; y medio de cultivo DMEM, con el que se pretende simular un plasma sanguíneo básico, y que fue suplementado progresivamente con L-glutamina, penicilina/estreptomicina y FBS, de cara a reproducir de forma más fiel las condiciones reales del flujo sanguíneo⁴⁵.

En las Figuras 2.29 a 2.32 se muestran las distribuciones del tamaño hidrodinámico de las MNPs tras 0, 24, 72 y 96 h de incubación en los distintos fluidos biológicos analizados, así como una representación gráfica de la variación de los valores medios de dicha magnitud con el tiempo de incubación en cada medio. Los valores promedios de los diferentes tamaños hidrodinámicos se muestran en la Tabla 2.8. Durante el periodo de ensayo, los sistemas permanecieron en una placa de agitación orbital a una velocidad de 200 rpm a temperatura ambiental, a fin de prevenir, en la medida de lo posible, la agregación y posterior precipitación de las MNPs como consecuencia de la no despreciable atracción magnética dipolar entre las mismas, dado el presumible comportamiento débilmente ferrimagnético de las MNPs previamente comentado.

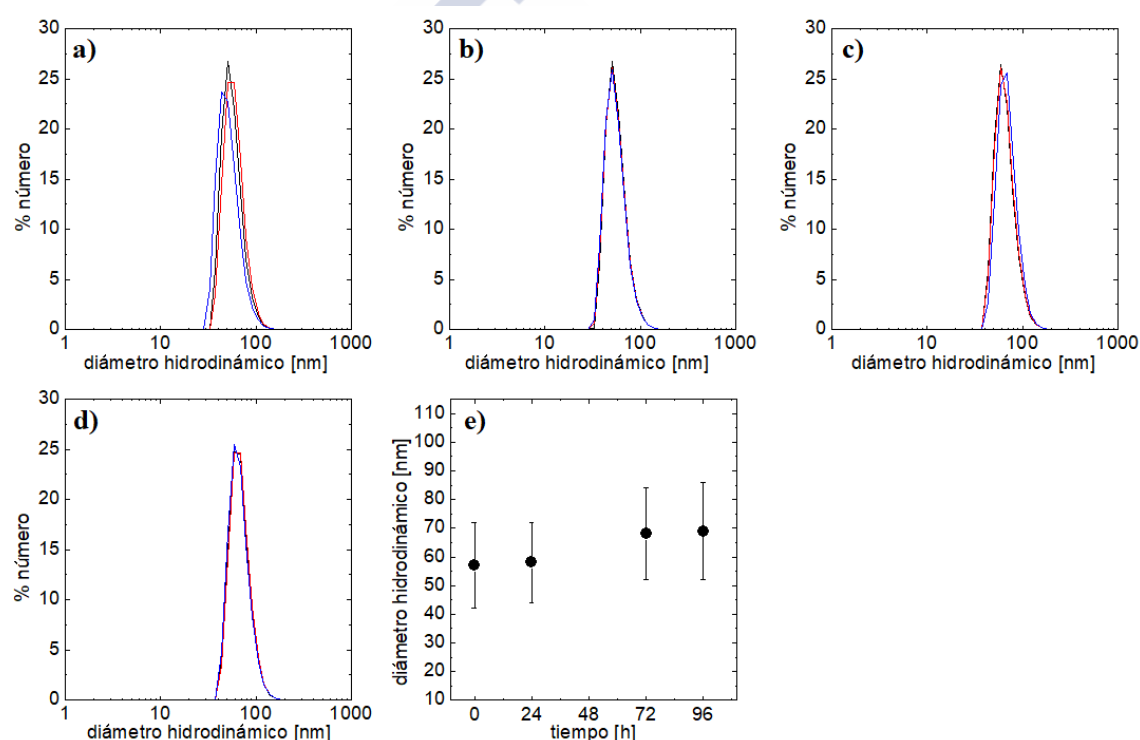


Figura 2.29: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en PBS tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h de incubación. e) Variación del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en PBS con el tiempo de incubación.

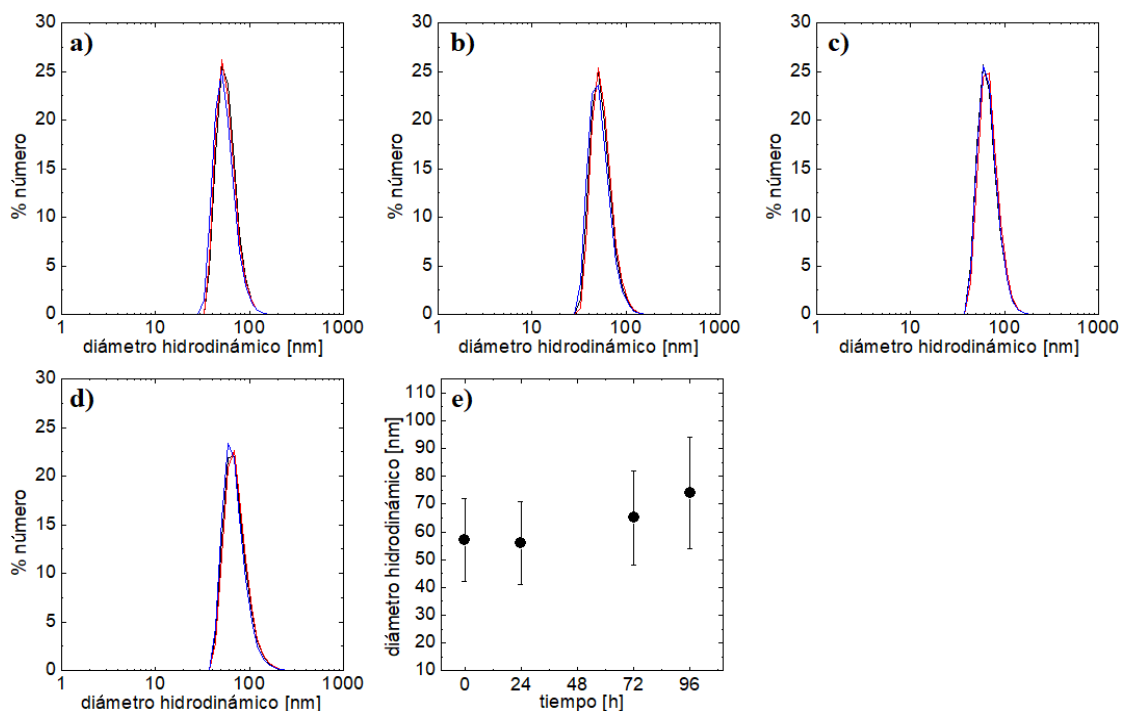


Figura 2.30: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en PSF tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h de incubación. e) Variación del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en PSF con el tiempo de incubación.

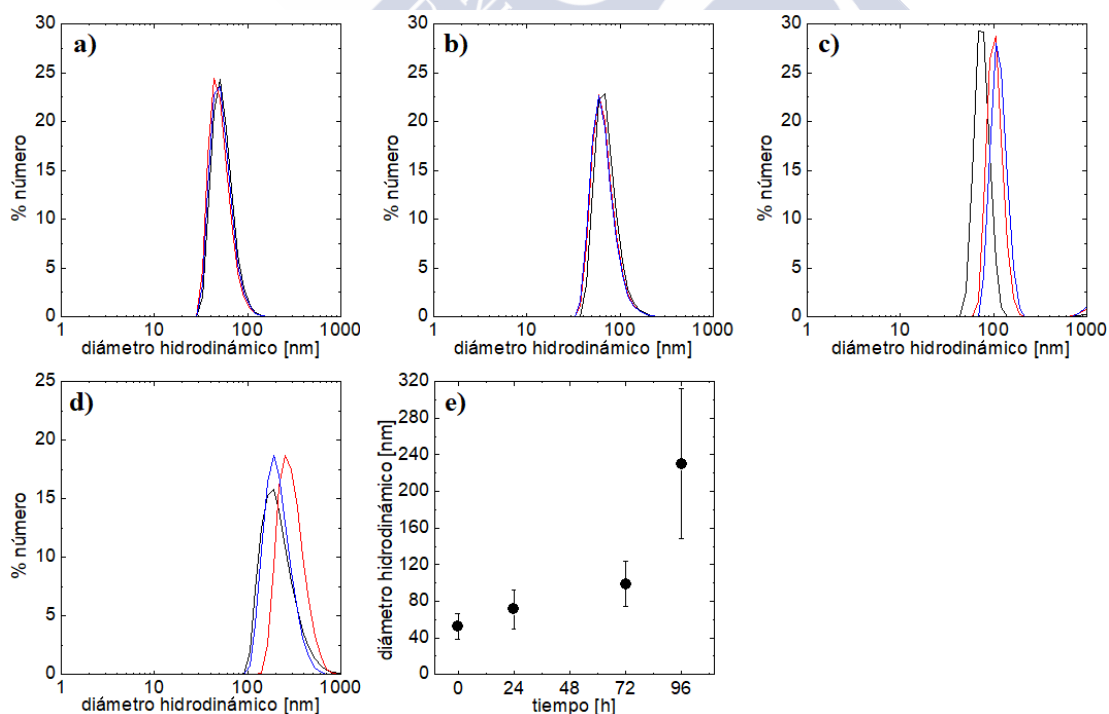


Figura 2.31: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en DMEM-glutamina-penicilina tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h de incubación. e) Variación del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en DMEM-glutamina-penicilina con el tiempo de incubación.

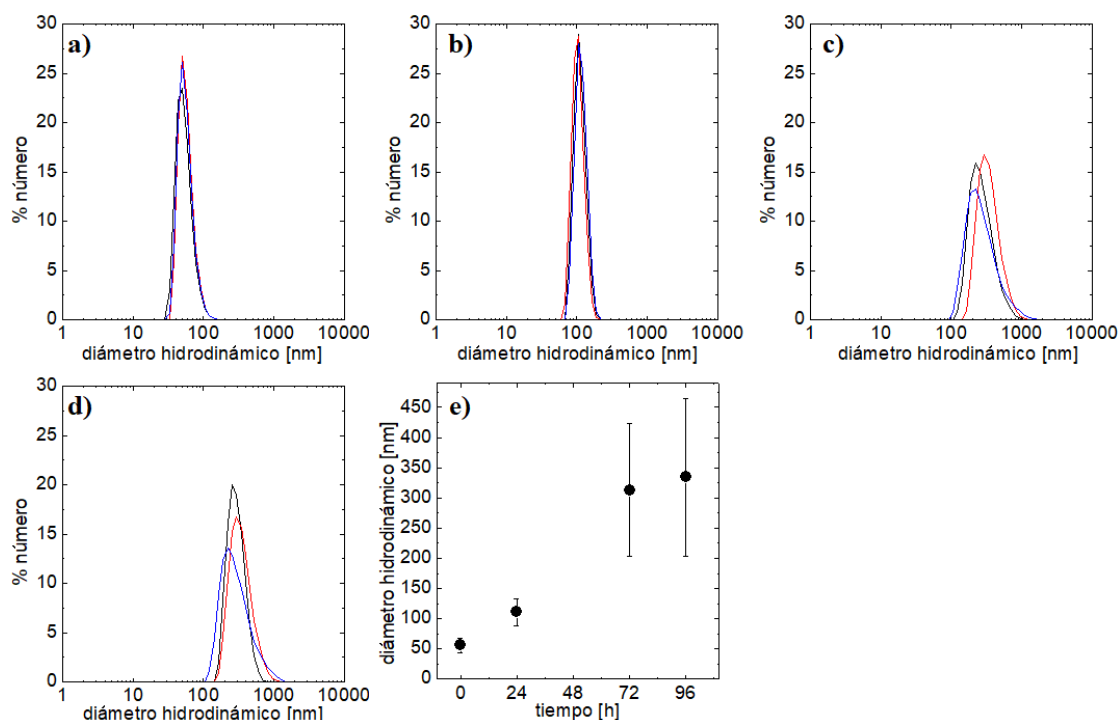


Figura 2.32: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en DMEM-glutamina-penicilina-FBS tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h de incubación. e) Variación del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en DMEM-glutamina-penicilina-FBS con el tiempo de incubación.

Tabla 2.8: Valores promedio del diámetro hidrodinámico de los nanocubos de ca. 40 nm de longitud de arista y composición $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ en los diferentes medios biológicos ensayados a los distintos tiempos de incubación.

	Diámetro hidrodinámico nanocubos [nm]			
	0 h	24 h	72 h	96 h
PBS	57 ± 15	58 ± 14	68 ± 16	69 ± 17
PSF	57 ± 14	56 ± 15	65 ± 17	74 ± 20
DMEM+glut+pen	53 ± 14	71 ± 21	99 ± 25	230 ± 82
DMEM+glut+pen+FBS	56 ± 12	111 ± 22	310 ± 120	320 ± 130

En las Figuras 2.33 a 2.35 y en la Tabla 3.9, por su parte, se muestran los datos correspondientes a los estudios de estabilidad en las disoluciones de NaCl en agua a las diferentes concentraciones de electrólito.

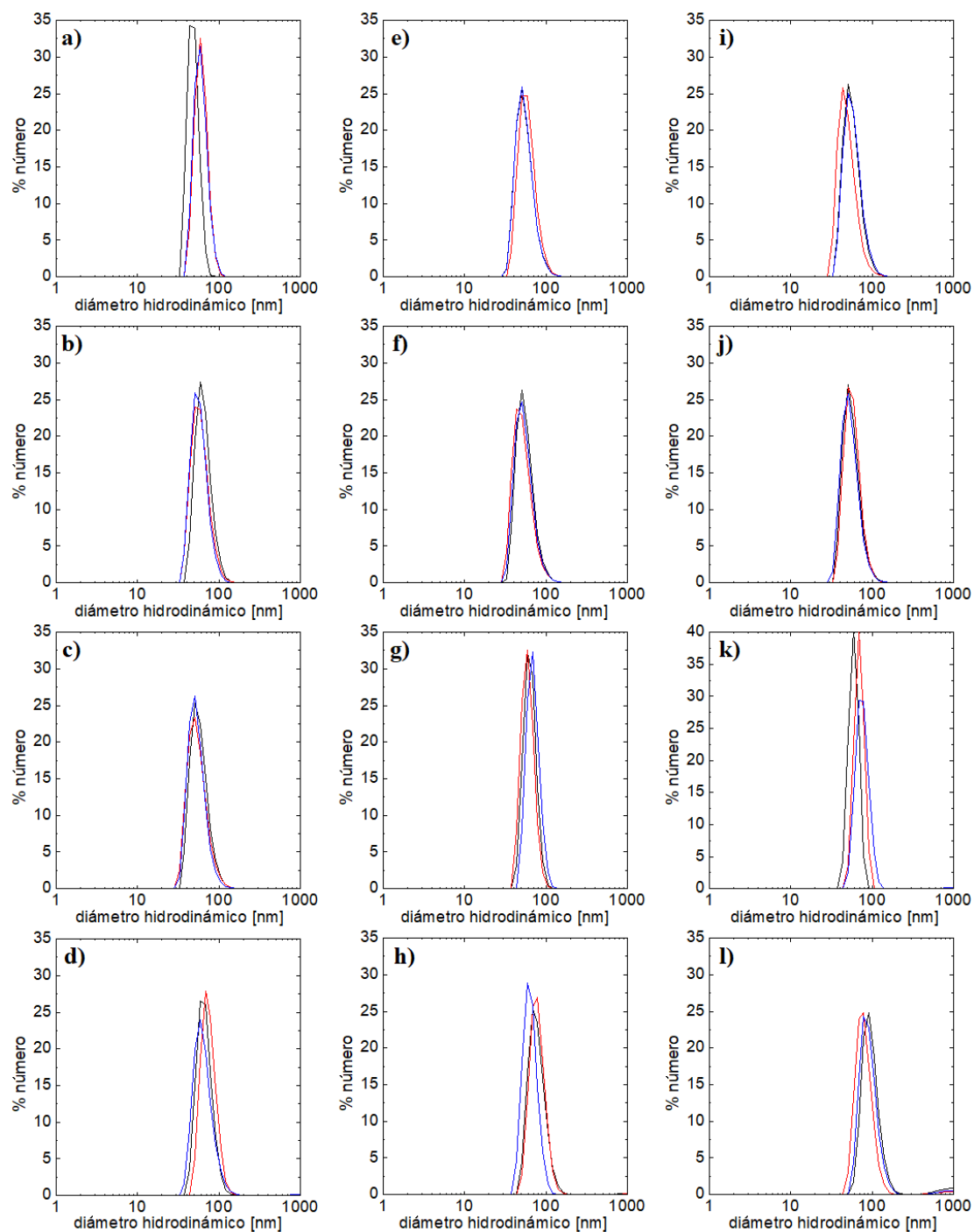


Figura 2.33: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en disolución salina de concentración 0.02 M tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h de incubación; 0.10 M tras e) 0h, f) 24h, g) 72h y h) 96h de incubación; y 0.20 M tras i) 0h, j) 24h, k) 72h y l) 96h de incubación.

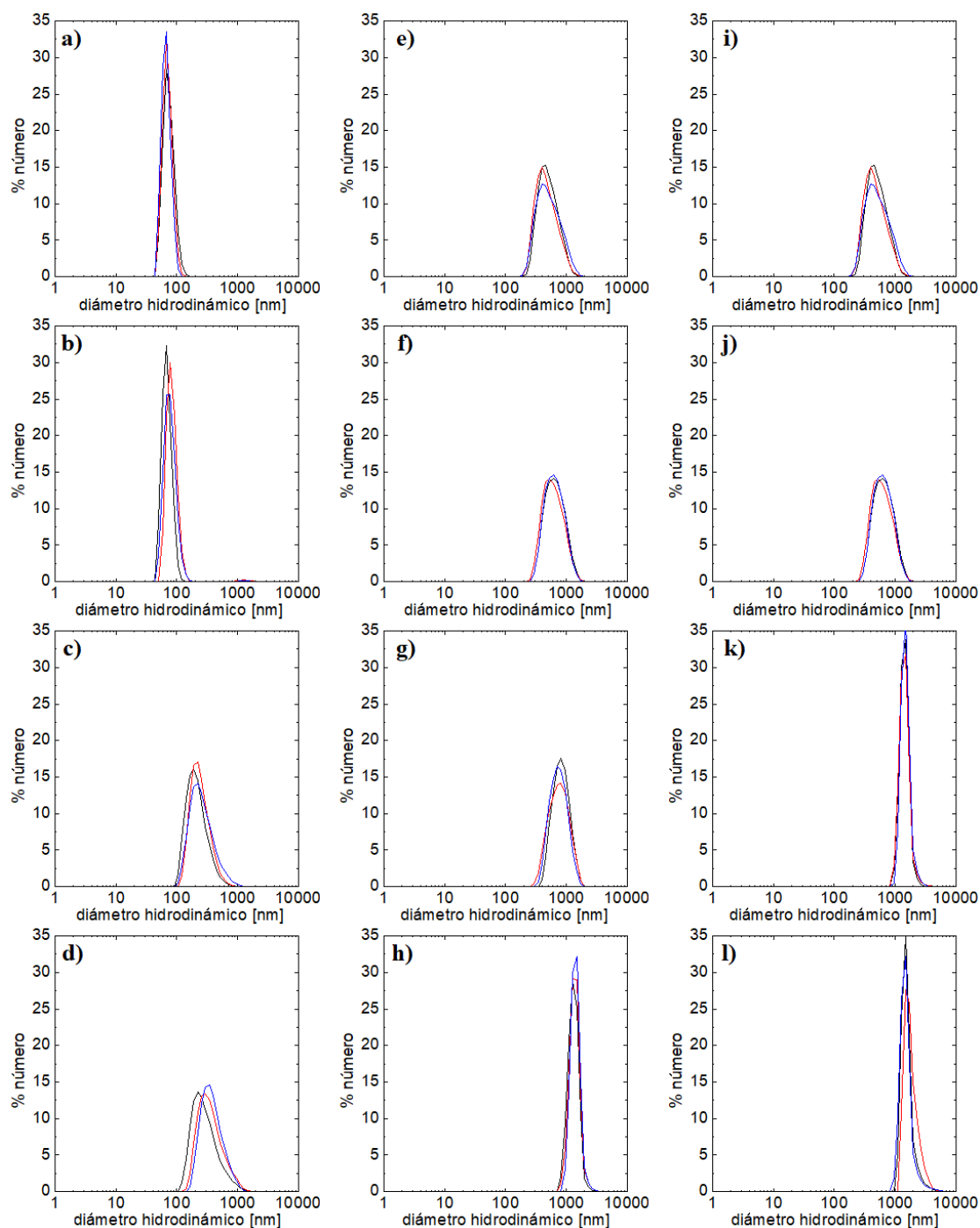


Figura 2.34: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en disolución salina de concentración 0.50 M tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h de incubación; 1.50 M tras e) 0h, f) 24h, g) 72h y h) 96h de incubación; y 2.50 M tras i) 0h, j) 24h, k) 72h y l) 96h de incubación.

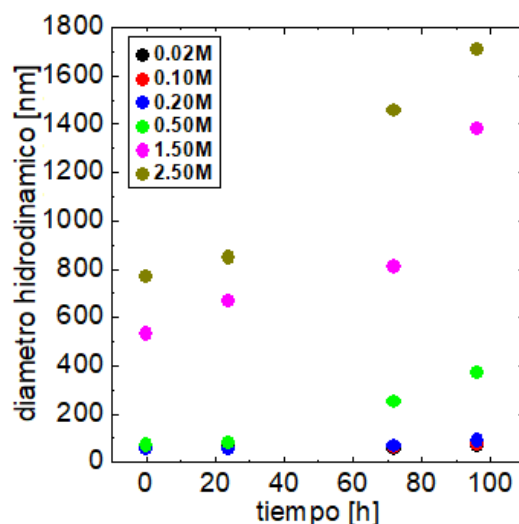


Figura 2.35: Variación del tamaño hidrodinámico de los nanocubos con el tiempo de incubación en las diferentes disoluciones de NaCl en agua. Se muestran los datos experimentales sin las correspondientes barras de incertidumbre dado que muchas de estas se solapan dificultando la correcta visualización de la gráfica.

Tabla 2.9: Valores promedio del diámetro hidrodinámico de los nanocubos de 40 nm de arista de composición $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ en las disoluciones acuosas de NaCl de diferente concentración a los distintos tiempos de incubación.

	Diámetro hidrodinámico nanocubos [nm]			
	0 h	24 h	72 h	96 h
NaCl 0.02M	57 ± 11	61 ± 15	57 ± 14	69 ± 17
NaCl 0.10M	58 ± 14	55 ± 15	65 ± 12	75 ± 18
NaCl 0.20M	56 ± 13	57 ± 14	69 ± 13	90 ± 23
NaCl 0.50M	71 ± 13	78 ± 16	250 ± 110	370 ± 180
NaCl 1.50M	530 ± 230	670 ± 250	810 ± 270	1380 ± 280
NaCl 2.50M	770 ± 250	850 ± 350	1460 ± 280	1710 ± 420

Las medidas de los tamaños hidrodinámicos de los nanocubos durante el período de incubación en los distintos medios biológicos nos permiten extraer ciertas conclusiones acerca de su grado de agregación y, en consecuencia, de su estabilidad coloidal. En primer lugar, se observa que tanto en PBS como en PSF los tamaños hidrodinámicos de las MNPs cúbicas apenas varían durante las 96 h de incubación, de

lo que se deduce la estabilidad total del sistema estudiado en los citados medios. En DMEM modificado con L-glutamina y penicilina/estreptomicina, por su parte, el tamaño hidrodinámico se mantiene en el mismo rango de valores que en los dos medios anteriores durante las primeras 24 h de incubación. Al cabo de 72 h, el tamaño de las partículas aumenta ligeramente, hasta casi 100 nm, si bien no lo suficiente como para hablar de una pérdida de estabilidad. Tras 96 h de incubación el tamaño hidrodinámico se incrementa por encima de 230 nm, lo cual da lugar, ahora sí, a una importante disminución de la estabilidad coloidal de las MNPs, que se manifiesta en la formación de pequeños precipitados en el fondo del recipiente que contiene la disolución de NPs. En el caso de DMEM suplementado también con FBS, el comportamiento es similar al anteriormente descrito, si bien en este caso la pérdida de estabilidad ya se hace patente al cabo de 72 h de incubación, con tamaños hidrodinámicos superiores a 300 nm como consecuencia de la agregación de las partículas y/o un fenómeno de adsorción de proteínas sobre sus superficies, dando lugar a lo que se conoce como corona proteica⁴⁶.

En las disoluciones acuosas de NaCl, por su parte, las MNPs muestran un tamaño hidrodinámico constante y una estabilidad total en las tres concentraciones de sal más bajas ensayadas: 0.02 M, 0.10 M y 0.20 M. A la concentración de 0.50 M el tamaño hidrodinámico se incrementa de forma notable a partir de 72 h de incubación; mientras que a las concentraciones de 1.50 M y 2.50 M de NaCl los nanocubos dejan de ser estables y forman importantes precipitados de forma inmediata, con tamaños hidrodinámicos cercanos a 2000 nm al cabo de las 96 h de incubación.

De este modo, se puede concluir que los nanocubos magnéticos con una longitud de arista de ca. 40 nm y recubiertos con el complejo polimérico PMA-dodecilamina muestran un elevado grado de estabilidad tanto en medios de baja carga iónica, como el PBS, como en disoluciones salinas (NaCl) de molaridad inferior a 0.50 M. Asimismo, también presentan una estabilidad total tras 96 h de incubación en PSF, medio que simula el microambiente de interior de los fagolisosomas formados al penetrar las NPs en el interior celular. Por su parte, en los medios DMEM modificados que se ensayaron, los nanocubos no mostraron en ningún caso incrementos notables del tamaño hidrodinámico hasta transcurridas 72 h de incubación, período tras el cual los fenómenos de agregación de las MNPs y/o la adsorción superficial de componentes biológicos sí que ocasionaron una pérdida de estabilidad que llegó a ser visible a través de la formación de precipitados. Esta relativa pérdida de estabilidad de los nanocubos

tras 72 h de incubación, si bien no deseable, no supone necesariamente un problema de cara a sus potenciales aplicaciones biológicas, dado que muchas de las mismas se efectúan en períodos de incubación no superiores a 12-24 h. De igual forma, la importante agregación que sufren las MNPs al ser introducidas en las disoluciones salinas de elevada fuerza iónica, superior a 0.50 M, tampoco supone un problema dado que la concentración salina en las diferentes zonas del cuerpo humano⁴⁷ no es en ningún caso superior a, aproximadamente, 0.15 M. Así pues, en lo tocante a la estabilidad coloidal de los nanocubos funcionalizados con el complejo polimérico PMA-dodecilamina en los distintos medios estudiados, se concluye que estos poseen las características necesarias para su implementación en sistemas biológicos reales a fin de una hipotética evaluación de sus potenciales aplicaciones biomédicas.

2.2.2.4. Estudio de las MNPs transferidas a medio acuoso por intercambio de ligando mediante medidas de TEM, DLS, FTIR y determinación del potencial ζ

Como se comentó previamente, se estudió también un procedimiento alternativo al recubrimiento polimérico con el complejo PMA-dodecilamina para lograr la transferencia a medio acuoso de los nanocubos magnéticos obtenidos. Este consistió en un proceso de intercambio de ligando, usando para tal fin DMSA⁴⁸. En este caso, en vista de que los resultados preliminares indicaban que los nanocubos funcionalizados mediante el proceso de intercambio de ligando mostraban un grado de estabilidad ligeramente inferior al proporcionado por los recubrimientos poliméricos previamente explicados, se limitó el estudio a un menor número de NPs. Así, se estudiaron los nanocubos de óxido de hierro resultantes de la síntesis típica, con una longitud de arista de 48.0 ± 4.0 nm, y aquellos obtenidos al disminuir la concentración de la disolución precursora a 200 mM, también sin dopaje, con un tamaño de 41.1 ± 3.1 nm.

Tras transferir los dos tipos de MNPs mencionados a medio acuoso mediante el proceso de intercambio de ligando con DMSA, en primer lugar se analizó su grado de agregación y potenciales cambios morfológicos mediante TEM, a fin de comprobar si el procedimiento provoca fenómenos de aglomeración entre las MNPs constituyentes. En la Figura 2.36 se puede constatar que las MNPs conservan en su mayoría su morfología cúbica original, pudiendo observarse, sin embargo, pequeños agregados. Esta agregación puede ser consecuencia del proceso de secado que sufren las MNPs una vez

depositadas en la rejilla para su caracterización por microscopía, por lo que se procedió a la evaluación de las características de los sistemas en disolución a fin de corroborar este fenómeno.

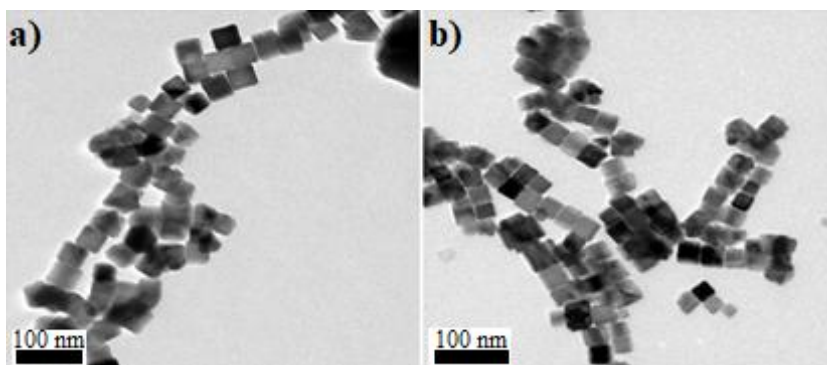


Figura 2.36: Imágenes TEM de los nanocubos de óxido de hierro de a) 41.1 ± 3.1 nm y b) 48.0 ± 4.0 nm transferidos a medio acuoso mediante la técnica de intercambio de ligando con DMSA.

En las dos MNPs funcionalizados con DMSA se observó que, transcurridos varios días de incubación en medio acuoso, aparecieron pequeñas cantidades de material precipitado en el fondo de los recipientes que contenían las disoluciones. Este fenómeno, que también sucedía en las MNPs modificadas con el complejo PMA-dodecilamina, se atribuye al carácter débilmente ferrimagnético que muestran las MNPs cúbicas como consecuencia de su tamaño y morfología, no siendo necesariamente sintomático de un incorrecto proceso de transferencia de fase. Sin embargo, en este caso la precipitación de las MNPs sucedía en un periodo de tiempo notablemente inferior, puesto que transcurridas aproximadamente 36-48 h la cantidad de material precipitado ya era elevada, mientras que en las muestras recubiertas con el complejo polimérico PMA-dodecilamina este fenómeno no comenzaba a ser evidente hasta pasada prácticamente una semana. A fin de evaluar con datos experimentales este comportamiento se midieron los tamaños hidrodinámicos de las dos MNPs funcionalizadas con DMSA, obteniéndose las distribuciones estadísticas que se muestran en la Figura 2.37.

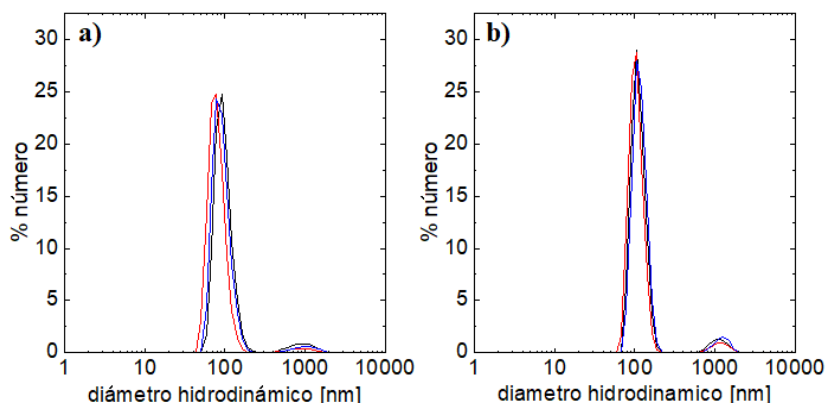


Figura 2.37: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de óxido de hierro de tamaño a) 41.1 ± 3.1 nm y b) 48.0 ± 4.0 nm modificados con DMSA.

Los nanocubos con unos tamaños de arista de 41.1 ± 4.1 y 48.0 ± 4.0 nm modificados con DMSA muestran unas poblaciones principal de MNPs con unos tamaños hidrodinámicos de 99 ± 21 y 115 ± 26 nm, respectivamente. Se trata de unos tamaños que aproximadamente duplican los medidos en NPs de similares características modificados con el complejo PMA-dodecilamina, lo cual da pie a concluir que las MNPs funcionalizadas con DMSA y transferidas a medio acuoso sufren de forma inmediata pequeños fenómenos de agregación constituyéndose en forma de dímeros o trímeros. Además, en las distribuciones estadísticas de los tamaños hidrodinámicos de ambas muestras también se observa la existencia de pequeñas poblaciones de MNPs con un tamaño hidrodinámico en el entorno de los 1000 nm (988 y 1113 nm, respectivamente), lo cual no hace sino confirmar que el protocolo seguido para el intercambio de ligando con DMSA no previene completamente la agregación de las partículas. Pueden ser dos las posibles causas de la existencia de los fenómenos de agregación antes descritos: i) una incorrecta ejecución del proceso de intercambio de ligando, de forma que las moléculas de DMSA no se hayan unido a la superficie de las MNPs, o bien ii) la incapacidad del recubrimiento de mitigar la interacción entre las MNPs. De cara a resolver esta cuestión se determinaron las distribuciones de potencial ζ y se llevaron a cabo medidas de FTIR, para así comprobar si las moléculas de DMSA están presentes en la superficie libre de los nanocubos. En este caso, y dado que el comportamiento cualitativo de las dos nanosistemas estudiados resultó muy similar, se analizaron sólo los nanocubos con un tamaño de arista de 48.0 ± 4.0 nm (Figura 2.38).

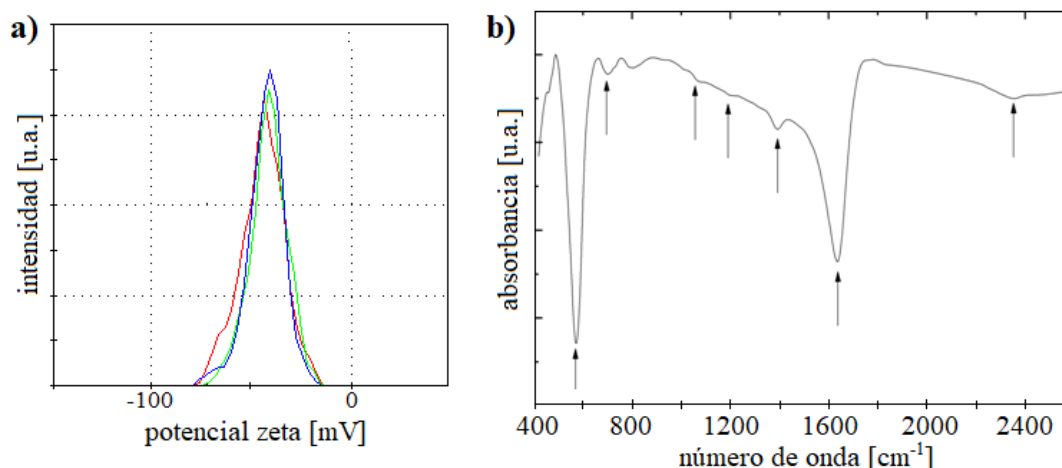


Figura 2.38: a) Distribución estadística del potencial ζ y b) espectro FTIR de los nanocubos de óxido de hierro 48.0 ± 4.0 nm modificados con DMSA.

Las medidas de potencial ζ de los nanocubos funcionalizados con DMSA deparan una distribución estadística con un solo pico de anchura no excesivamente elevada, lo cual da lugar a pensar en la existencia de un recubrimiento uniforme de todas las MNPs. El valor promedio fue de -42.9 ± 9.8 mV, estando esta carga negativa en consonancia con la presencia de las moléculas del ligando en la superficie de las MNPs, siendo proporcionada por el carboxilato ionizado y/o los grupos tiolato de la molécula de DMSA no unidos a la superficie de los nanocubos⁴⁸. Por su parte, las medidas de espectroscopía infrarroja también parecen confirmar el correcto recubrimiento de las MNPs con el DMSA⁴⁹. El espectro obtenido muestra una banda ancha en aproximadamente 1620 cm^{-1} correspondiente a la vibración del enlace C=O. La banda presente a 1370 cm^{-1} , por su parte, es debida a las vibraciones de los grupos CH₂, mientras que a 2340 cm^{-1} se observa una débil señal asociada a la vibración de los enlaces S-H. Por último, la banda situada a 1178 cm^{-1} puede ser asignada a los estiramientos del enlace C=O antes mencionado, correspondiéndose la situada en 1055 cm^{-1} a las vibraciones del enlace S-CH. La señal detectada a 545 cm^{-1} , por su parte, se asocia a la vibración de los enlaces Fe-O de la magnetita.

De este modo, las pruebas efectuadas a los sistemas de nanocubos modificados superficialmente con DMSA mediante un proceso de intercambio de ligando permitieron determinar que la funcionalización se llevó a cabo de forma exitosa, determinándose mediante los datos de potencial ζ y FTIR la presencia de las moléculas

de DMSA en la superficie libre de las MNPs. Sin embargo, la caracterización de los sistemas magnéticos mediante TEM y DLS mostró una tendencia a la conformación de pequeños agregados de MNPs, fenómeno que se corrobora por la aparición de importantes cantidades de material precipitado en la base de los recipientes que contenían las disoluciones acuosas de los nanocubos modificados.

Por tanto, se concluye que, de cara a obtener MNPs de los tamaños estudiados altamente estables en medio acuoso, el proceso de recubrimiento con el complejo polimérico PMA-dodecilamina proporciona resultados más satisfactorios que el proceso de intercambio de ligando con DMSA. A pesar de que en ambos casos se constató la correcta unión de los compuestos a la superficie libre de los nanocubos, el complejo polimérico semeja más eficaz de cara a suavizar las fuerzas de atracción de carácter dipolar existentes entre los mismos, evitando la conformación de agregados durante un periodo temporal más largo. Es importante destacar que se efectuaron diferentes pruebas incrementando la cantidad de DMSA utilizada en el proceso de funcionalización, así como otras aumentando hasta 72 h el tiempo de reacción de las disoluciones de MNPs y DMSA bajo agitación mecánica, no produciéndose ninguna variación destacable respecto a los resultados previamente expuestos.

2.2.2.5. Estudio de la estabilidad en medios biológicos de las MNPs transferidas a medio acuoso por intercambio de ligando

A pesar de que los ensayos efectuados en el apartado previo parecen indicar una cierta tendencia a la agregación de los nanocubos funcionalizados con DMSA, se llevó a cabo un estudio preliminar de la estabilidad de los mismos en medios biológicos. Para ello, se llevaron a cabo medidas de la variación del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de óxido de hierro de 48.0 ± 4.0 nm en el seno de dos fluidos biológicos de diferente complejidad: HEPES y DMEM suplementado con penicilina/estreptomicina, L-glutamina y FBS. Con el HEPES, al igual que se hizo previamente con el PBS, se pretenden simular las condiciones de concentración iónica y osmolaridad del fluido extracelular humano, obedeciendo este cambio a la alta afinidad de los iones fosfato del PBS por la superficie de las MNPs de óxido de hierro, pudiendo desplazar de este modo a las moléculas débilmente adsorbidas como pueden ser las de DMSA⁵⁰. Por su parte, como ya se mencionó previamente, el medio de cultivo DMEM pretende simular un

plasma sanguíneo básico, que es suplementado con penicilina/estreptomicina, L-glutamina y FBS de cara a reproducir de forma más fiel las condiciones reales del flujo sanguíneo.

En las Figuras 2.39 y 2.40 se muestran las distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de las MNPs tras 0, 24, 72, 96 y 168 h de incubación en los dos fluidos biológicos mencionados, así como una representación gráfica de la variación de los valores medios de dichos tamaños hidrodinámicos (Tabla 2.10) con el tiempo de incubación en cada medio. Al igual que se hizo en los ensayos de estabilidad de los nanocubos recubiertos poliméricamente, durante el tiempo de estudio los sistemas permanecieron en una placa de agitación orbital a una velocidad de 200 rpm, a fin de prevenir, en la medida de lo posible, la agregación y posterior precipitación de las MNPs como consecuencia de la no despreciable atracción magnética dipolar entre las mismas.

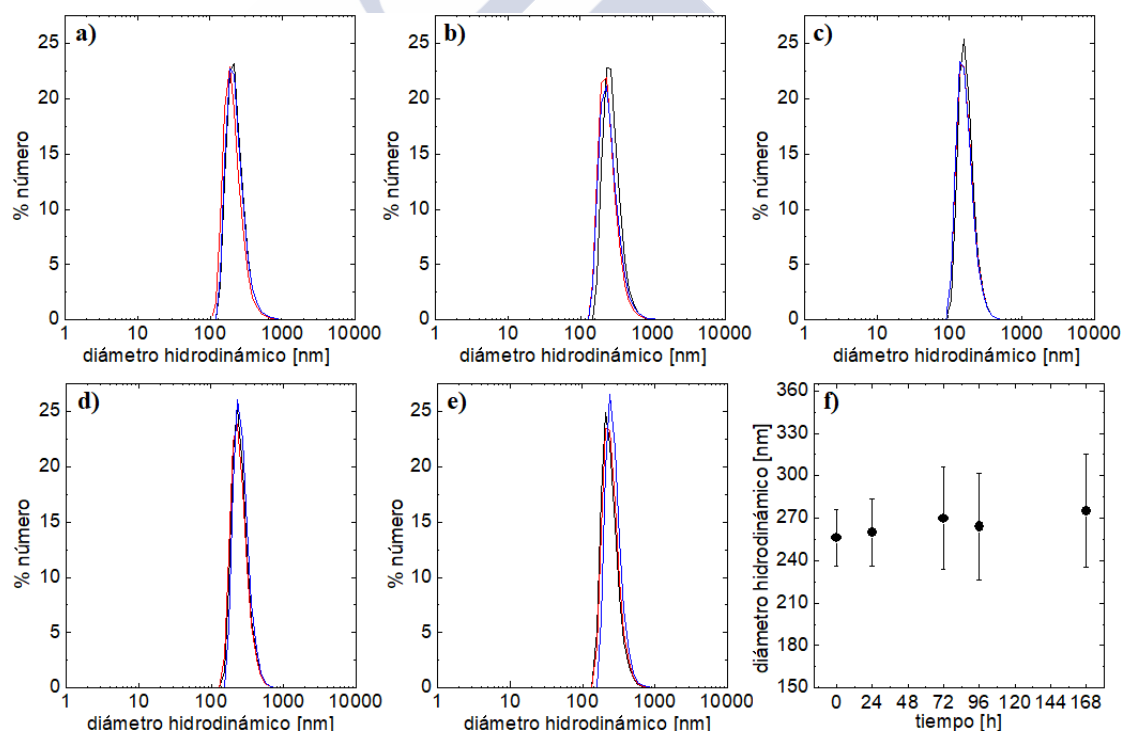


Figura 2.39: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en HEPES tras a) 0h, b) 24h, c) 72h, d) 96h y e) 168h de incubación. f) Variación del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en HEPES con el tiempo de incubación.

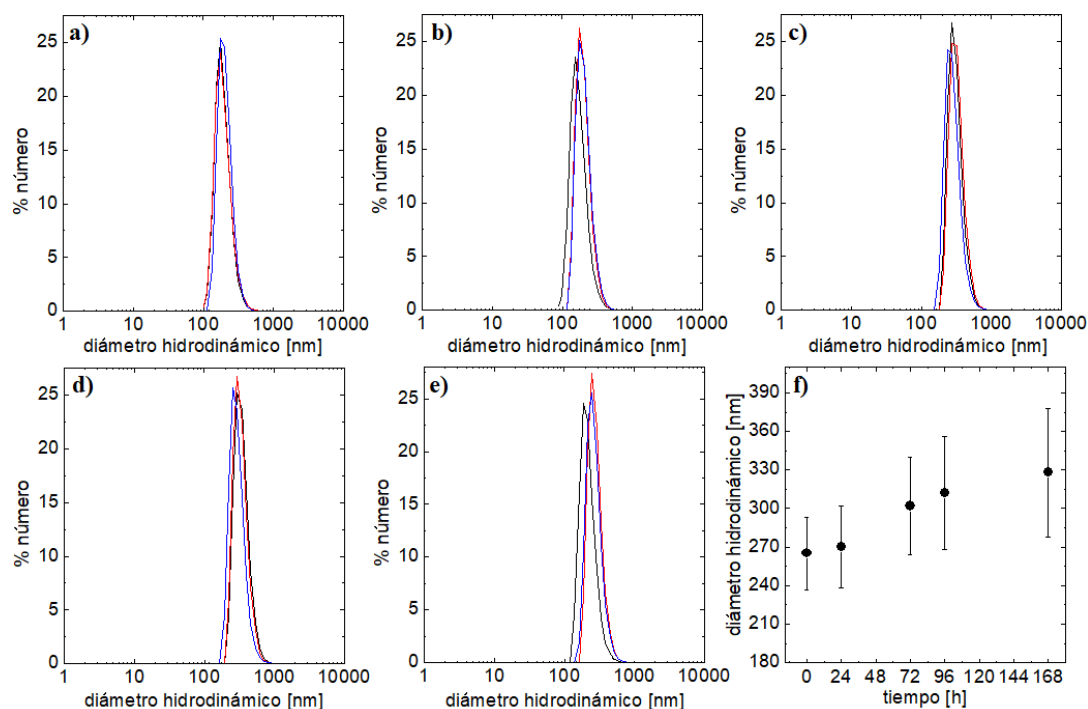


Figura 2.40: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de los nanocubos en DMEM-glutamina, penicilina-FBS tras a) 0h, b) 24h, c) 72h, d) 96h y e) 168h de incubación. e) Variación del tamaño de los nanocubos en DMEM-glutamina-penicilina-FBS con el tiempo de incubación.

Tabla 2.10: Valores promedio del tamaño hidrodinámico de los nanocubos de óxido de hierro de 48.0 ± 4.0 nm funcionalizados con DMSA en los diferentes medios biológicos ensayados.

	Diámetro hidrodinámico nanocubos [nm]				
	0 h	24 h	72 h	96 h	168 h
HEPES	256 ± 20	260 ± 24	270 ± 36	268 ± 38	276 ± 40
DMEM+glut+pen+FBS	265 ± 28	272 ± 32	302 ± 40	312 ± 44	331 ± 49

Tal y como era de esperar en vista de los resultados previos, los nanocubos muestran en los dos medios biológicos estudiados unos valores de tamaños hidrodinámicos que indican un grado de agregación no despreciable. Tanto en HEPES como en DMEM suplementado, los valores de los tamaños hidrodinámicos medidos superan los 250 nm inmediatamente después de preparar las disoluciones de MNPs, lo cual, dado el tamaño de los nanocubos, da pie a pensar en la formación instantánea de agregados formados por varias unidades de MNPs. Llama la atención que, a pesar de esta agregación inicial, durante el resto del periodo de incubación el tamaño

hidrodinámico no varió en exceso, especialmente en HEPES, en el seno del cual el tamaño de los nanocubos permaneció muy constante durante la semana que duró el ensayo. En el DMEM suplementado sí se incrementó de forma más clara el tamaño, con valores superiores a 330 nm tras siete días de incubación. Así, tras largos tiempos de incubación, en DMEM suplementado las MNPS funcionalizadas con DMSA y las funcionalizadas con el complejo PMA-dodecilamina presentan un comportamiento similar, con valores de tamaño hidrodinámico semejantes.

Por todo ello, se confirma que la estabilidad proporcionada por los recubrimientos con DMSA es ligeramente inferior a la obtenida con los recubrimientos poliméricos previamente ensayados, dando lugar estos últimos a MNPs con un grado de agregación menor, especialmente a tiempos de incubación reducidos.

2.2.3. Caracterización magnética de los sistemas

En las secciones previas de este Capítulo se describió cómo se llevaron a cabo las síntesis de MNPs con morfología cúbica de diferentes tamaños y composiciones, obteniéndose además, mediante la variación de distintos parámetros del proceso de preparación, MNPs con formas octaédricas y cubooctaédricas. Todos los sistemas obtenidos fueron caracterizados mediante TEM, usando en algunos de ellos técnicas de caracterización suplementarias como XRD, FTIR o SAED. Se ensayaron dos procedimientos de transferencia a medio acuoso diferentes: un recubrimiento polimérico con el complejo PMA-dodecilamina y un intercambio de ligando con DMSA, mostrándose el primero de ellos como más eficaz de cara a la obtención de sistemas altamente estables en medios polares. En concreto, los sistemas de MNPs de forma cúbica con tamaños de arista de ca. 30 y 40 nm sintetizados, con diferentes grados de dopaje con manganeso, cobalto y zinc, fueron transferidos a medio acuoso mediante su recubrimiento con el complejo polimérico PMA-dodecilamina y, una vez funcionalizados, se evaluó la conservación del tamaño de las MNPs, así como su estabilidad coloidal, en diferentes fluidos biológicos.

El siguiente estudio llevado a cabo consistió en la caracterización magnética de varios de los sistemas de MNPs previamente sintetizados. Para ello, haciendo uso de un magnetómetro, se analizó el comportamiento de la magnetización con el campo

magnético aplicado, determinando de este modo los ciclos de histéresis magnética de los nanocubos¹⁰. Asimismo, para algunas de las muestras también se efectuaron medidas de magnetización frente a la temperatura para obtener las curvas ZFC y FC, estas últimas bajo un campo aplicado de 0.1 T. En concordancia con la mayoría de trabajos previos sobre el tema^{7,51}, todos los valores de magnetización medidos fueron normalizados en base a la masa total de metales presentes en las muestras (hierro más cobalto, zinc o manganeso), previamente determinada mediante medidas de ICP-MS.

El campo magnético aplicado para la medición de los ciclos de histéresis tuvo una amplitud máxima de 5 T en uno y otro sentido, valor *a priori* lo suficientemente elevado para que los sistemas entren en régimen saturado y así obtener las magnetizaciones de saturación de los mismos. En algunas medidas, debido a problemas de funcionamiento del equipo, sólo se pudo alcanzar un valor máximo de amplitud del campo magnético de 1 T, comprobándose que esta también resulta suficiente, si bien de forma mucho más ajustada, para la determinación de las saturaciones. Para la obtención de los ciclos de histéresis, el campo magnético fue variado según se indicó en la Tabla 2.2, tomando una mayor cantidad de datos experimentales a campos magnéticos de baja amplitud, zona dónde pequeñas variaciones en esta magnitud implican importantes cambios en los valores de magnetización.

2.2.3.1. Efecto de la temperatura sobre los ciclos de histéresis

En primer lugar, se midieron los ciclos de histéresis magnética a diferentes temperatura de los nanocubos de magnetita con un tamaño de arista de 48.0 ± 4.0 nm resultantes de la llamada síntesis típica (Figura 2.41a). Se estudió un amplio rango de temperaturas, comprendido entre 5 K y 300 K para, de este modo, poder determinar de modo global cómo afecta esta magnitud a las características magnéticas del sistema de partículas estudiado. Varias de las curvas obtenidas se solapan en muchos de sus puntos haciendo que dicha representación sea difícil de interpretar. Por ello, se muestran simultáneamente dos imágenes ampliadas de diferentes zonas de la misma, a fin de poder observar con detalle las diferencias entre el comportamiento magnético de estas MNPs a las distintas temperaturas implementadas. En la gráfica en la que se representan los valores de magnetización medidos a bajas amplitudes del campo magnético aplicado, se pueden observar las diferencias entre las magnetizaciones remanentes y los

campos coercitivos a las diferentes temperaturas (Figura 2.41b), mientras que en la gráfica correspondiente a altos valores de amplitud del campo magnético se pueden determinar de forma nítida las diferentes magnetizaciones de saturación (Figura 2.41c). En la Tabla 2.11, por su parte, se muestran los valores numéricos de dichas magnitudes en los nanocubos de 48.0 ± 4.0 nm obtenidos en la llamada síntesis típica a las distintas temperaturas estudiadas. Los valores de los campos coercitivos serán indicados en todo este Capítulo en Oersteds (Oe), una unidad más adecuada que los Teslas (T) dados los órdenes de magnitud habituales de las coercitividades a temperatura ambiental en MNPs de estas dimensiones ($1 \text{ T} = 10^4 \text{ Oe}$).

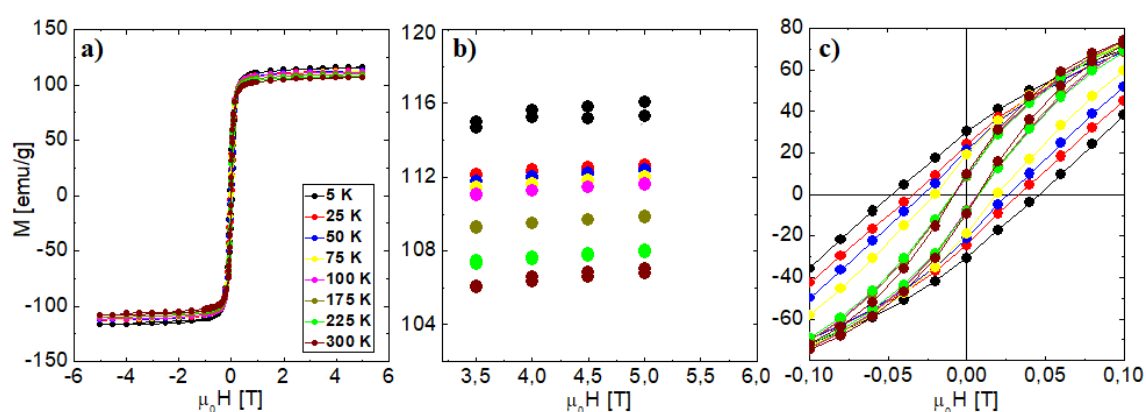


Figura 2.41: a) Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado de los nanocubos resultantes de la síntesis típica a diferentes temperaturas. Imágenes ampliadas a campos magnético de b) alta intensidad y c) baja intensidad.

Tabla 2.11: Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos estudiados a cada temperatura.

T [K]	H _c [Oe]	M _S [emu/g]	M _R [emu/g]
5	472.2	116.7	30.6
25	342.7	112.7	26.2
50	278.2	112.4	23.6
75	198.7	112.0	22.4
100	80.6	111.6	17.6
175	77.5	109.9	17.2
225	77.0	108.6	17.0
300	75.3	108.0	18.2

Como tendencia general, se observa claramente que a medida que se disminuye la temperatura los valores de campo coercitivo, magnetización de saturación y magnetización remanente de las MNPs estudiadas tienden a aumentar, siendo este fenómeno especialmente relevante a temperaturas inferiores a 100 K (Figura 2.42). Al disminuir la temperatura y las consecuentes fluctuaciones térmicas debidas a la misma, los momentos magnéticos se orientan de forma más fácil según el campo aplicado, dando lugar a magnetizaciones más elevadas. El campo coercitivo, por su parte, se puede entender como una magnitud que cuantifica la energía necesaria para desmagnetizar una muestra tras aplicarle un campo, por lo que en base a lo explicado anteriormente también es lógico que su valor sea más elevado a bajas temperaturas⁵².

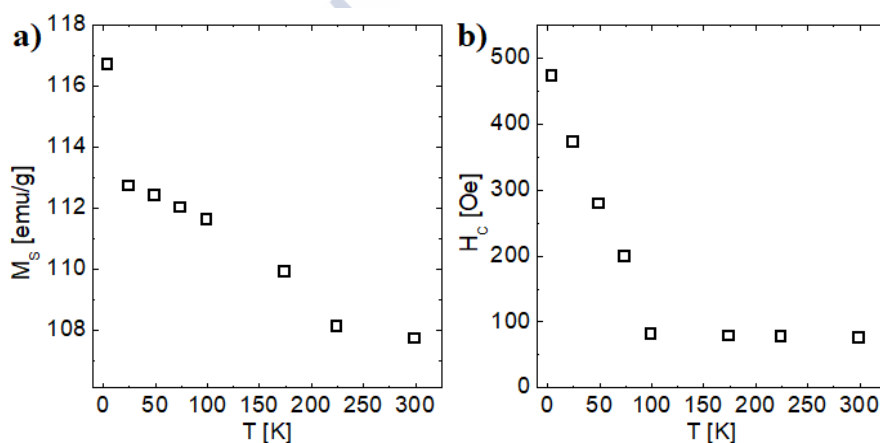


Figura 2.42: Representaciones gráficas de a) magnetización de saturación, y b) campo coercitivo frente a temperatura de los nanocubos de 48.0 ± 4.0 nm de magnetita.

Los valores de las magnetizaciones de saturación obtenidos se pueden comparar con los publicados en trabajos previos, aunque los distintos tamaños y morfologías concretas, así como los diferentes recubrimientos de las MNPs dificultan dicha comparación. Hyeon *et al.*¹⁵, por ejemplo, obtuvieron magnetizaciones de saturación a 300 K de aproximadamente 140 emu/g en nanocubos de 80 nm de arista, mientras que Pellegrino *et al.*⁵³ sintetizaron nanocubos de 35 nm en los que la magnetización de saturación era de aproximadamente 110 emu/g, valores en todos los casos normalizados frente a la masa de metales presentes en las MNPs. Por tanto, se observa que los valores de magnetización de saturación a temperatura ambiente de los nanocubos resultantes de la síntesis típica están dentro del rango de valores esperado.

Los valores no nulos del campo coercitivo y magnetización remanente, por su parte, son indicativos del carácter ferrimagnético de los nanocubos de 48.0 ± 4.0 nm. Como se explicó en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, el tamaño crítico de transición a régimen superparamagnético en MNPs de magnetita esféricas se encuentra alrededor de 15-20 nm, tamaño que aumenta ligeramente en el caso de que la morfología sea cúbica⁵⁴. Por ello, era esperable que los nanocubos estudiados presentasen ciclos de histéresis de áreas no nulas. También es destacable que a temperaturas superiores a aproximadamente 100 K el ferrimagnetismo que exhiben las MNPs es débil, lo cual se manifiesta a través de unos ciclos de histéresis de tamaño mucho más reducido que a temperaturas más bajas. Como también se comentó en el Capítulo de Introducción, esto es consecuencia del propio tamaño de los nanocubos, no excesivamente alejado del tamaño de transición al régimen superparamagnético, que permite que estos exhiban un ferrimagnetismo débil que se traduce en una reducida tendencia a la formación de agregados, factor importante de cara a sus potenciales aplicaciones, particularmente en el campo biomédico.

De cara a corroborar estos aspectos, se midieron las curvas FC y ZFC⁵⁵ de los nanocubos de magnetita de 48.0 nm (Figura 2.43). Tal y como era de esperar, en vista de los ciclos de histéresis medidos a diferentes temperaturas, la intersección total entre las curvas FC y ZFC no se produce por debajo de 300 K, lo cual confirma el comportamiento ferrimagnético antes explicado. Asimismo, también se observa que a una temperatura de aproximadamente 100 K las curvas FC y ZFC pasan a ser muy similares, lo cual está en consonancia con un ferrimagnetismo débil por encima de esta temperatura, que también se observaba en las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado. Así, se puede entender esta como una suerte de temperatura de bloqueo (aunque este concepto es solo aplicable a MNPs en el rango superparamagnético) por encima de la cual las MNPs, debido a su elevado tamaño, no llegan a presentar ciclos de histéresis de área nula, pero sí se reduce esta de forma ostensible.

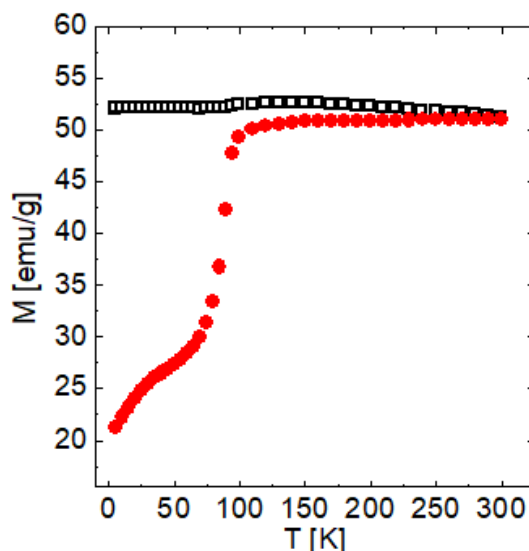


Figura 2.43: Curvas FC y ZFC de los nanocubos de magnetita obtenidos en la síntesis típica.

Por otra parte, llaman también la atención los valores relativamente elevados del llamado campo de irreversibilidad, magnitud que se corresponde con el valor de campo magnético al que las dos ramas del ciclo de histéresis se fusionan en una sola curva. En la muestra previamente analizada, el valor de este campo de irreversibilidad varía entre 2000 y 4000 Oe en función de la temperatura, valor que resulta relativamente elevado en comparación con el obtenido en estudios previos²². Estos valores elevados del campo de irreversibilidad en MNPs de magnetita suelen ser indicativos de la presencia de diferentes fases magnéticas, asociadas, a su vez, a la existencia de pequeñas zonas compuestas de hierro metálico en el seno del óxido de hierro, lo cual está en consonancia con las diferencias de contraste entre los diferentes nanocubos observadas en las imágenes de TEM, que ya fueron comentadas previamente.

Por último, el estudio llevado a cabo de la variación del campo coercitivo con la temperatura (Figura 2.42b) nos permite estimar la densidad de energía magnética de anisotropía de nuestro sistema, para así poder compararla con los valores determinados teóricamente para MNPs de óxido de hierro. El descenso en el valor del campo coercitivo al incrementar la temperatura en un sistema de MNPs superparamagnéticas no interactuantes con anisotropía magnética uniaxial y distribuidas aleatoriamente puede ser descrito mediante la expresión que se muestra en la ecuación 2.3.

$$H_C(T) = 0.96 \cdot \frac{K_{eff}}{M_s} \cdot (1 - \sqrt{T/T_B}) \quad (2.3)$$

siendo H_C el campo coercitivo, K_{eff} la densidad de energía magnética de anisotropía, M_s la magnetización de saturación, T la temperatura y T_B la temperatura de bloqueo²².

A pesar de que en este caso las MNPs estudiadas no presentan comportamiento superparamagnético, el hecho de que exhiban un comportamiento ferrimagnético débil permite usar la expresión anterior para calcular la densidad de energía magnética de anisotropía en primera aproximación. De este modo, el ajuste lineal de los datos de campo coercitivo medidos frente a los valores de $0.96 \cdot (1 - (T/T_B)^{1/2})/M_s$ da lugar a una recta cuya pendiente se corresponde con la densidad de energía anisotrópica buscada. El valor obtenido para los nanocubos de 48.0 nm de longitud de arista resultantes de la síntesis típica fue $K_{eff} = 4.34 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{m}^{-3}$, resultado similar al determinado de forma teórica para el óxido de hierro ($5.00 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{m}^{-3}$)²².

2.2.3.2. Efecto del tamaño y la morfología de las MNPs sobre los ciclos de histéresis

A continuación, se midieron los ciclos de histéresis a temperatura ambiente de los nanocubos de diferentes tamaños que se obtuvieron mediante las variaciones en el proceso sintético explicadas en apartados anteriores (Figura 2.44a). En concreto, se estudiaron los comportamientos magnéticos de MNPs cúbicas de óxido de hierro con un tamaño de arista de 33.3 ± 3.4 , 41.1 ± 3.1 , 48.0 ± 4.0 , 59.4 ± 5.4 y 94.2 ± 9.9 nm. En este caso, debido a problemas de funcionamiento en el magnetómetro en el que se efectuaron las medidas, sólo se pudieron alcanzar campos magnéticos con una amplitud máxima de 1 T que, sin embargo, resultó suficiente para la determinación de las magnitudes características de los ciclos de histéresis de las muestras estudiadas. Al igual que en el análisis de la dependencia de los ciclos de histéresis con la temperatura, se muestran simultáneamente imágenes ampliadas de las curvas a campos magnéticos pequeños, por una parte, y a campos magnéticos elevados dentro del rango estudiado, por otra (Figura 2.44b-c). De este modo, se pueden observar de forma más clara las diferencias de comportamiento entre los nanocubos de distintos tamaños analizados y determinar, de forma precisa, las magnitudes características del ciclo de histéresis de cada sistema, esto es, magnetizaciones remanentes, de saturación y campo coercitivo. Los valores numéricos de dichas magnitudes se muestran en la Tabla 2.12.

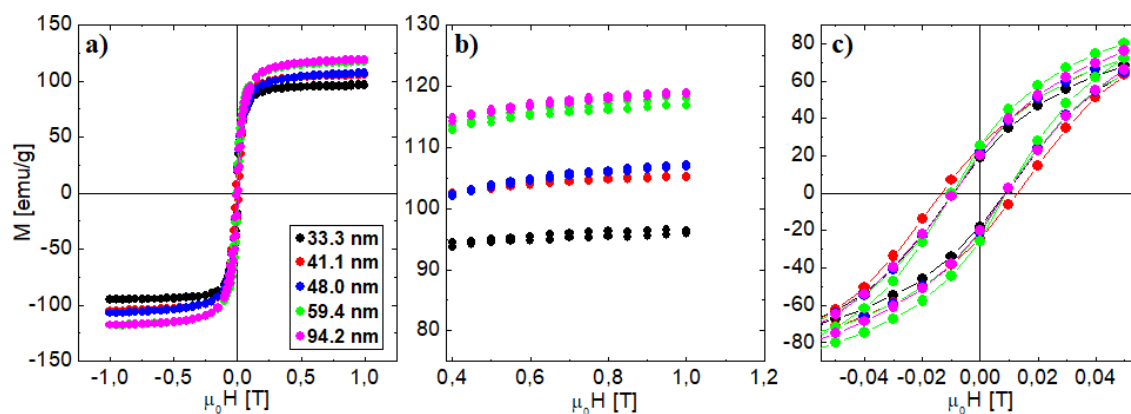


Figura 2.44: a) Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado de nanocubos de magnetita de diferentes tamaños. Imágenes ampliadas a campos magnético de b) alta intensidad y c) baja intensidad.

Tabla 2.12: Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos de magnetita de diferentes tamaños a 300 K.

Tamaño [nm]	H_c [Oe]	M_s [emu/g]	M_R [emu/g]
33.3 ± 3.4	70.6	101.9	19.3
41.1 ± 3.1	133.7	110.6	25.1
48.0 ± 4.0	75.3	111.3	22.2
59.4 ± 5.4	83.0	123.4	26.1
94.2 ± 9.9	88.0	124.3	25.5

Para la determinación lo más exacta posible de las magnetizaciones de saturación se consideró el hecho de que, en esta ocasión, no se pudieron aplicar campos magnéticos superiores a 1 T, valor al cual los sistemas aún no se encontraban de forma clara dentro del régimen saturado. Por ello, se hizo una extrapolación lineal a campo infinito que se tradujo, típicamente, en un incremento de 4-6 emu/g entre las magnetizaciones medidas a 1 T y las establecidas como magnetizaciones de saturación.

Tal y como era de esperar, las magnetizaciones de saturación aumentan a medida que se incrementa el tamaño de las MNPs^{56,57}, llegando a alcanzarse valores próximos a 125 emu/g en los nanocubos de mayor tamaño sintetizados (Figura 2.45a). A pesar de presentar la tendencia de crecimiento esperada, los valores de las saturaciones medidos en los nanocubos de los tamaños más grandes resultan ligeramente inferiores a los

esperados. Así, por ejemplo, y tal y como se mencionó anteriormente, Hyeon *et al*¹⁵. sintetizaron nanocubos de magnetita de 80 nm en los que midieron magnetizaciones de saturación a 300 K de aproximadamente 140 emu/g, por lo que la magnetización de saturación que se esperaba medir en el sistema de nanocubos de 94.2 nm que sintetizamos sería superior a los 125 emu/g que finalmente se obtuvieron. Esta diferencia puede ser atribuida a pequeñas impurezas y/o a la no perfecta cristalinidad de las NPs que, tal y como se comentó en el Capítulo de Introducción, da lugar a un aumento de los efectos de borde, lo que a su vez repercuten negativamente sobre la magnetización neta de los sistemas al aplicarles un campo magnético⁵⁸. Sin embargo, con total probabilidad la baja magnetización de saturación medida en el sistema de nanocubos de 94.2 ± 9.9 nm esté influenciada también por el relativamente elevado grado de polidispersidad de la muestra, el cual se demuestra por el alto valor de incertidumbre que acompaña al tamaño promedio.

En lo referente a los campos coercitivos, como norma general, el valor de estos tiende a decrecer a medida que se disminuye el tamaño de los nanocubos (Figura 2.45b). Este es el comportamiento esperado, dado que cuanto más próximo sea el tamaño de las MNPs al de la transición al régimen superparamagnético más débil será el ferrimagnetismo que mostrarán, lo cual se manifiesta en un ciclo de histéresis de tamaño progresivamente más reducido⁵⁶. El único sistema que no sigue este comportamiento es el de los nanocubos con tamaño de 41.1 ± 3.1 nm, cuyo valor de campo coercitivo es notablemente mayor que el de MNPs de tamaños superiores, lo cual puede ser de nuevo atribuido a una baja cristalinidad de la muestra, lo que provoca una disminución del tamaño de transición a régimen superparamagnético y, en consecuencia, un aumento del área del ciclo de histéresis al alejarse del mismo; o bien, a la aparición de fenómenos de agregación entre las MNPs durante el proceso de secado para las medidas en el magnetómetro. El hecho de que ninguna muestra presente campo coercitivo nulo demuestra que, debido a su tamaño, ninguna de ellas se encuentra en el régimen superparamagnético⁹. Por su parte, la pequeña diferencia existente entre el campo coercitivo de las NPs de 59.4 nm y de 94.2 nm puede implicar que entre dichos valores la gráfica de coercitividad frente a tamaño presenta el punto de inflexión típico de la transición entre los regímenes monodominio y multidominio⁵⁹. Esto está en concordancia con los valores típicos de este tamaño crítico previamente determinados

teórica y experimentalmente^{20,60,61}, que en MNPs de magnetita, en función de su morfología y demás características estructurales, suele encontrarse entre 70 y 85 nm.

La remanencia, por su parte, se incrementa en general con el tamaño de las MNPs cúbicas, si bien en este caso todos los valores se encuentran bastante próximos. Al igual que sucedía con el campo coercitivo, los nanocubos de 41.1 nm presentan un valor aparentemente más elevado del que cabría esperar si se comparan con las demás MNPs, lo cual confirma las alteraciones de esta muestra comentadas anteriormente. Además, los nanocubos de 59.4 nm presentan un valor de remanencia superior al de la muestra de 94.2 nm, rompiendo la tendencia esperada, si bien se trata de valores muy próximos entre sí.

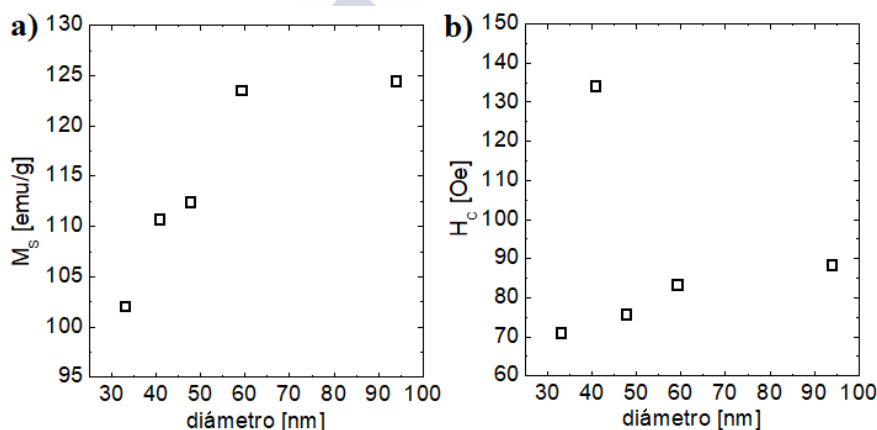


Figura 2.45: Representaciones gráficas de a) magnetización de saturación, y b) campo coercitivo frente al tamaño de los nanocubos de magnetita.

En general, como ya se ha comentado, los nanocubos de magnetita de distintos tamaños estudiados presentan unos ciclos de histéresis magnética con un área bastante reducida a temperatura ambiente (300 K). Esta característica, como se explicó en páginas anteriores, implica un comportamiento ferrimagnético débil que, a su vez, da lugar a que las MNPs no muestren una tendencia importante a formar agregados al ser sometidas a un campo magnético externo.

Por otra parte, también fue analizado el comportamiento magnético de los octaedros de 52.1 ± 6.1 nm, que se obtuvieron al incrementar la velocidad de la rampa de calentamiento del proceso de síntesis a $16\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, y de los cubooctaedros de 55.3 ± 8.1 nm logrados al aplicar una razón molar $R=4$ entre el ácido oleico y el precursor

ferroso. Se midieron en cada caso las curvas de magnetización frente al campo magnético aplicado a 5 K y a 300 K (Figura 2.46).

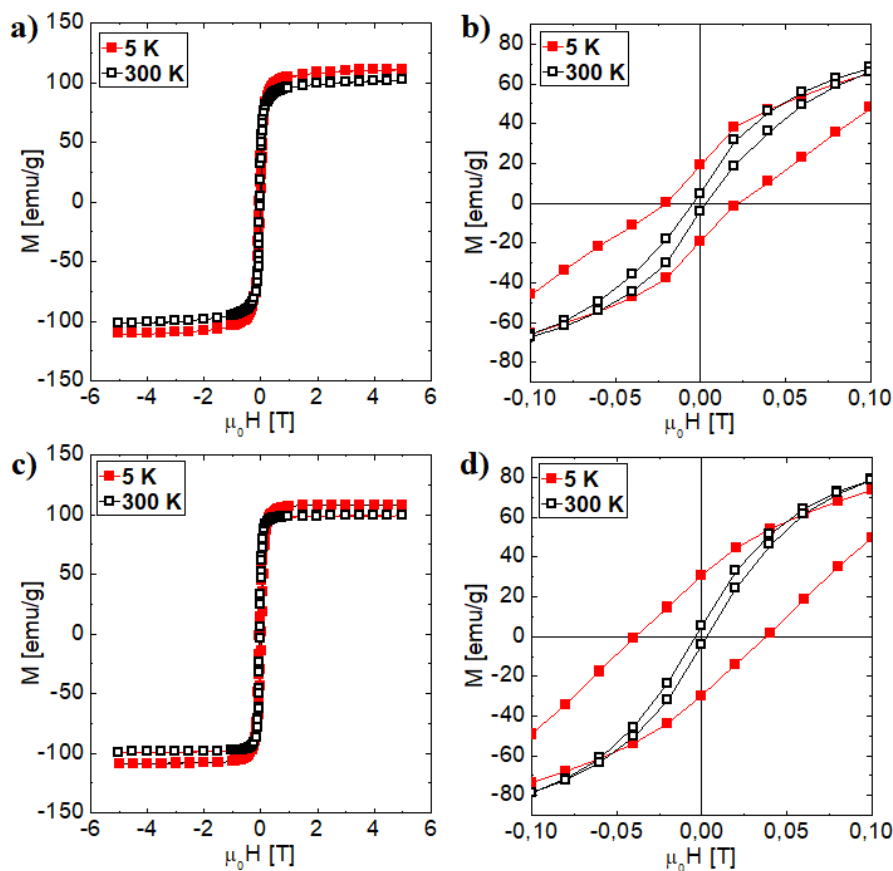


Figura 2.46: Curvas de magnetización frente al campo magnético aplicado a 5 K y a 300 K de octaedros de 52.1 nm: a) ciclo de histéresis completo, b) imagen ampliada a campos bajos; y cubooctaedros de 55.3 nm: c) ciclo de histéresis completo, d) imagen ampliada a campos bajos.

Los octaedros de 52.1 nm presentan unas magnetizaciones de saturación a 5 K y a 300 K de 111.5 y 102.6 emu/g, respectivamente, mientras que en los cubooctaedros de 55.3 nm estas magnitudes toman valores de 108.9 y 100.0 emu/g, respectivamente. Se trata, en ambos tipos de MNPs, de valores inferiores a los medidos en los nanocubos de 48.0 nm resultantes de la síntesis típica, a pesar de que el tamaño de estos últimos es ligeramente inferior. La explicación de esta diferencia se encuentra en la “anisotropía ideal” de las MNPs cúbicas, que mantienen en su superficie la simetría de coordinación existente en el seno de la estructura cristalina⁵. De este modo, el porcentaje de momentos magnéticos que no se orientan según la dirección del campo magnético aplicado debido a efectos de superficie es mínimo en las MNPs con forma cúbica, lo

que a su vez se traduce en una mayor magnetización neta. Los campos coercitivos a 5 K y a 300 K, por su parte, son de 214.0 y 39.4 Oe en los octaedros, y de 381.6 y 49.8 Oe en los cubooctaedros, respectivamente, en ambos casos inferiores a los medidos en los nanocubos de 48.0 nm. Dado que se trata de MNPs con una menor simetría y de un tamaño mayor que los nanocubos, lo esperable sería que presentasen unos ciclos de histéresis con mayor área. En ambos casos, las muestras presentan una distribución estadística de tamaños bastante ancha, en las que además están presentes de manera no despreciable MNPs con otras morfologías distintas de las de la población principal, lo que puede explicar, al menos en parte, el comportamiento anómalo observado⁶². En lo referente a la comparación entre las características magnéticas las MNPs octaédricas y cubooctaédricas, esta resulta complicada de llevar a cabo dada la sola existencia de una muestra de cada morfología y los distintos tamaños de las MNPs constituyentes de las mismas.

2.2.3.3. Efecto del dopaje de las MNPs cúbicas sobre los ciclos de histéresis

Por último, se midieron los ciclos de histéresis a temperatura ambiente de los diferentes nanocubos de ca. 30 y 40 nm que fueron preparados introduciendo en la estructura de los mismos diferentes elementos dopantes (cobalto, zinc y manganeso). No se analizaron la totalidad de las muestras sintetizadas dado que algunas de ellas consistían en MNPs de tamaños y composiciones bastante similares, en cuyo caso se escogió sólo una de las mismas. Al igual que sucedió en el análisis efectuado previamente sobre la dependencia de las características de los ciclos de histéresis con el tamaño de los nanocubos, debido a problemas de funcionamiento en el magnetómetro en el que se efectuaron las medidas sólo se pudieron alcanzar campos magnéticos con una amplitud máxima de 1 T. Se estudiaron en primer lugar los nanocubos de ca. 30 y 40 nm que fueron dopados con cobalto en diferentes proporciones, obteniéndose los ciclos de histéresis magnética que se muestran en la Figura 2.47a. Llama la atención, en primer lugar, las elevadas áreas que presentan los ciclos de histéresis de varias de las partículas obtenidas. De cara a observar dichos ciclos en mayor detalle se muestran también las imágenes ampliadas a campos magnéticos aplicados de baja y elevada amplitud (Figura 2.47b-c), pudiendo verse en la Tabla 2.13 los valores de las magnitudes características.

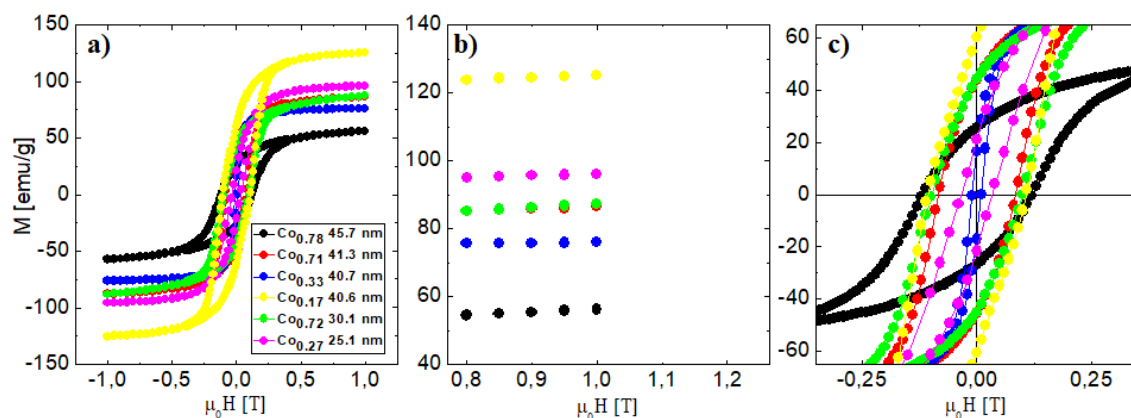


Figura 2.47: a) Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado a 300 K de los nanocubos de ca. 30 nm y 40 nm dopados con cobalto. Imágenes ampliadas a campos magnético de b) alta intensidad y c) baja intensidad.

Tabla 2.13: Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos dopados con cobalto.

Composición	Tamaño [nm]	H_c [Oe]	M_S [emu/g]	M_R [emu/g]
$\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$	40.6 ± 2.6	1069.3	130.2	59.8
$\text{Co}_{0.33}\text{Fe}_{2.67}\text{O}_4$	40.7 ± 2.7	94.2	81.3	16.1
$\text{Co}_{0.71}\text{Fe}_{2.29}\text{O}_4$	41.3 ± 2.7	836.6	91.5	44.6
$\text{Co}_{0.78}\text{Fe}_{2.22}\text{O}_4$	45.7 ± 4.3	1190.2	61.2	26.2
$\text{Co}_{0.27}\text{Fe}_{2.73}\text{O}_4$	25.1 ± 1.8	340.1	100.9	21.5
$\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$	30.1 ± 2.1	992.5	92.2	44.8

A fin de intentar establecer una relación de dependencia entre el porcentaje de cobalto presente en la estructura de los nanocubos y las características magnéticas de los mismos se representaron gráficamente las magnitudes asociadas a los ciclos de histéresis magnética frente a la estequiometría de cobalto en las MNPs, previamente determinada mediante ICP-MS (Figura 2.48).

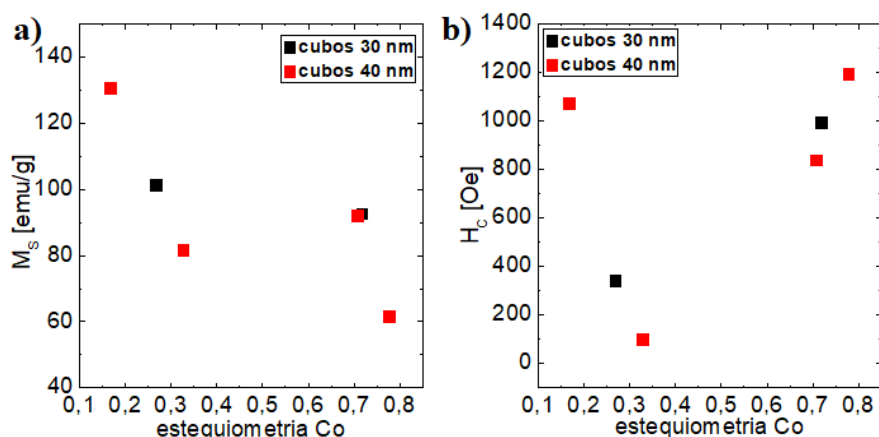


Figura 2.48: Representaciones gráficas de a) magnetización de saturación y b) campo coercitivo frente a la cantidad de cobalto en los nanocubos dopados de ca. 30 y 40 nm.

Como tendencia general, en la imagen anterior se observa que la magnetización de saturación de los nanocubos decrece a medida que aumenta la presencia de cobalto en los mismos. Los valores de campo coercitivo, por su parte, muestran un comportamiento opuesto al anterior, aumentando progresivamente con la cantidad del elemento dopante estudiado, al menos a partir de relaciones estequiométricas superiores a aproximadamente 0.30.

Las diferencias entre los nanocubos de 30 y 40 nm, tal y como se comprobó en el estudio de la dependencia de las propiedades magnéticas de las MNPs con su tamaño, efectuado en páginas anteriores, no es muy notable. De este modo, el estudio de las características magnéticas de los nanocubos obtenidos en función de la presencia de cobalto puede ser efectuado independientemente de si su tamaño es de 30 ó 40 nm.

Las formas en las que el campo coercitivo y la magnetización de saturación cambian con la cantidad de cobalto antes descritas solo dejan de seguirse en dos de las muestras. Así, los nanocubos de ca. 40 nm de composición $\text{Co}_{0.33}\text{Fe}_{2.67}\text{O}_4$ presentan unos valores de estas magnitudes ligeramente inferiores a los que cabría esperar si observamos los medidos en las demás muestras, si bien se trata de diferencias mínimas que pueden ser atribuidas a pequeños problemas de agregación o a una menor cristalinidad de las MNPs. Los nanocubos de 40 nm y composición $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, por su parte, presentan un valor de campo coercitivo muy elevado en comparación con las demás MNPs. Nótese que, como norma general (y tal y como se explicará

posteriormente que era esperado), el campo coercitivo aumenta a medida que se incrementa la proporción de cobalto. Esta tendencia se rompe de forma manifiesta en estas MNPs, que son las que tienen una menor cantidad de cobalto y sin embargo presentan una de las coercitividades más elevadas. Esta anomalía puede ser atribuida a diferentes causas: i) un error en la determinación de la cantidad de cobalto mediante ICP-MS, ii) un importante fenómeno de agregación de las MNPs al ser secadas para efectuar la medida en el magnetómetro, aumentando de esta forma el tamaño de las unidades constituyentes del sistema magnético y, en consecuencia, como se vio previamente, el campo coercitivo⁵⁶, o bien iii) una baja cristalinidad de la muestra, con múltiples defectos estructurales que incrementen su coercitividad.

Las magnetizaciones remanentes, por su parte, varían con la presencia de cobalto de forma similar al campo coercitivo. Sin embargo, los datos medidos de esta magnitud se encuentran todos ellos en un rango bastante reducido de valores, de forma que pequeñas variaciones en los mismos, debidas a problemas de pureza de las muestras y/o a la formación de pequeños agregados de grupos reducidos de MNPs, como consecuencia de la atracción dipolar entre las mismas, impiden determinar de forma clara la dependencia de esta magnitud con el grado de dopaje del elemento estudiado⁶³.

Para explicar por qué el cobalto afecta de esta forma a las magnitudes características de los ciclos de histéresis magnética, debe considerarse que este elemento se dispone en las posiciones octaédricas de la estructura de espinela de la magnetita, dando lugar a una estructura de espinela inversa^{2,64}. Así, la presencia de este dopante no altera la cancelación del efecto de los momentos magnéticos de los cationes Fe^{3+} situados en posiciones octaédricas y tetraédricas³⁵, de modo que, al igual que en las MNPs de magnetita pura, el momento neto total será debido exclusivamente a los cationes situados en posiciones octaédricas⁶⁵ (Fe^{2+} y Co^{2+}). Conocido esto, la caída en los valores de las magnetizaciones de saturación al incrementar la cantidad de cobalto es esperable, dado que el momento magnético de los átomos de hierro es mayor que el de los átomos de cobalto⁶⁶ (2.2 frente a 1.7 magnetones de Bohr). Esta pequeña diferencia explica que el descenso en las magnetizaciones de saturación en las MNPs dopadas con respecto a las MNPs de óxido de hierro puras no sea excesivamente importante, excepción hecha de las muestras con mayor presencia de cobalto en las que, además del efecto del dopante, debe tenerse en cuenta, como se indicó en páginas previas, que los nanocubos presentan unos bordes más rugosos y una morfología menos definida, lo cual

contribuye de forma negativa a su magnetización neta. Si se comparan los datos experimentales obtenidos con otros obtenidos en trabajos previos^{51,67}, y teniendo en cuenta la complicación en las comparaciones dadas las características singulares de tamaño, morfología y composición de las MNPs que se obtienen en los distintos estudios, se observa, como regla general, que los dopajes con cobalto dan lugar a descensos en los valores de las magnetizaciones de saturación, siendo estos en general poco importantes, incluso inferiores a los medidos en el presente trabajo. De esta manera, se confirma, además, el comportamiento anómalo de la muestra de composición $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, cuya magnetización de saturación es superior a la de los nanocubos de óxido de hierro no dopados de tamaño similar.

El ya comentado incremento observado en los campos coercitivos al dopar las MNPs con cobalto, por su parte, también está de acuerdo con los datos obtenidos en trabajos efectuados previamente⁶⁸. Este fenómeno también se asocia a la disposición de los cationes de cobalto en las posiciones octaédricas de la estructura de espinela de las ferritas. Al situarse en estas posiciones, en la que los iones están empaquetados de forma muy densa, se produce un incremento de la llamada tensión microestructural, dado que los átomos de cobalto presentan un peso atómico notablemente superior al de los de hierro⁶⁹. Esta tensión o estrés microestructural genera, a su vez, un aumento de la anisotropía de las MNPs que se traduce en un aumento del campo coercitivo característico de cada sistema de NPs, que será mayor cuanto mayor sea la presencia de cobalto en el mismo.

Los nanocubos de ca. 30 y 40 nm dopados con zinc en diferentes proporciones dieron lugar a los ciclos de histéresis magnética que se muestran en la Figura 2.49a. Las representaciones gráficas ampliadas a campos magnéticos de alta y baja amplitud (Figuras 2.49b-c) permiten determinar las magnitudes características de los ciclos de histéresis de los nanocubos dopados con zinc (Tabla 2.14). Nótese que, debido nuevamente a problemas en el equipo de medida, las curvas se obtuvieron aplicando un campo magnético con una amplitud máxima de 1 T, por lo que nuevamente se hizo una extrapolación a campo infinito para determinar de forma precisa las magnetizaciones de saturación, aumentando estas entorno a 4-6 emu/g con respecto a las medidas bajo un campo magnético aplicado de 1 T.

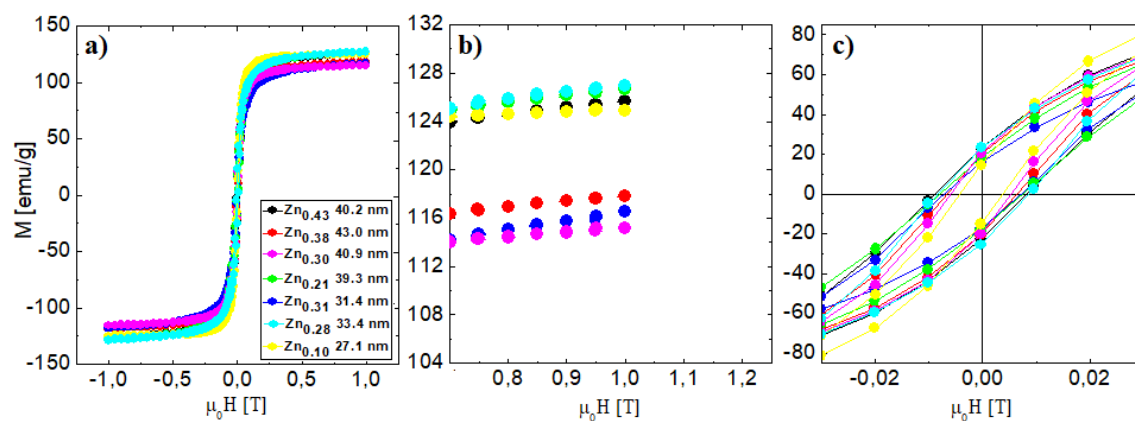


Figura 2.49: a) Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado a 300 K de los nanocubos de ca. 30 nm y 40 nm dopados con zinc. Imágenes ampliadas a campos magnético de b) alta intensidad y c) baja intensidad.

Tabla 2.14: Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos dopados con zinc.

Composición	Tamaño [nm]	H _c [Oe]	M _s [emu/g]	M _R [emu/g]
Zn _{0.21} Fe _{2.79} O ₄	39.3 ± 2.4	76.8	131.8	18.0
Zn _{0.30} Fe _{2.70} O ₄	40.9 ± 3.3	55.9	120.2	19.9
Zn _{0.38} Fe _{2.62} O ₄	43.0 ± 3.6	64.5	117.9	19.8
Zn _{0.43} Fe _{2.57} O ₄	40.2 ± 3.0	84.9	130.8	22.5
Zn _{0.10} Fe _{2.90} O ₄	27.1 ± 3.6	39.8	130.0	14.3
Zn _{0.28} Fe _{2.72} O ₄	33.4 ± 3.8	85.7	132.1	23.9
Zn _{0.31} Fe _{2.69} O ₄	31.4 ± 3.0	71.1	121.6	16.4

La representación gráfica de las magnitudes recogidas en la Tabla 2.14 frente al contenido en zinc de los nanocubos determinado mediante medidas de ICP-MS permite observar de forma más clara cómo afecta la presencia de este elemento dopante a las características magnéticas de las MNPs (Figura 2.50).

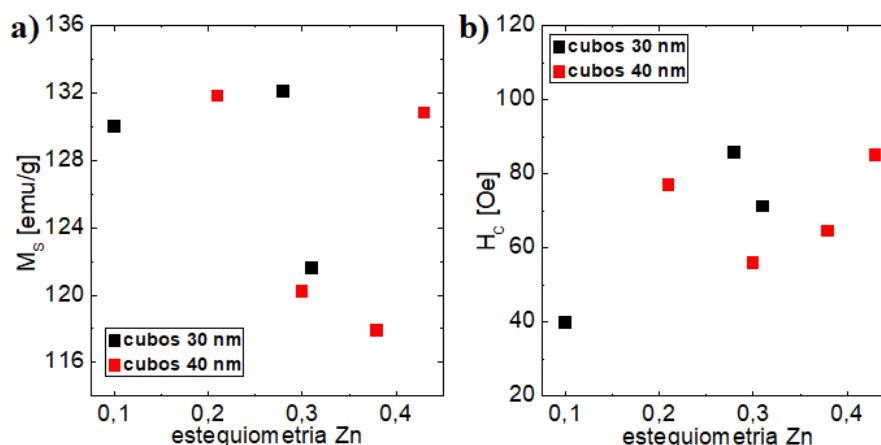


Figura 2.50: Representaciones gráficas de a) magnetización de saturación, y b) campo coercitivo frente a la cantidad de zinc en los nanocubos dopados de ca. 30 y 40 nm.

En primer lugar, y al igual que se concluyó en el caso del dopado con cobalto, se observa que los nanocubos de 30 y 40 nm pueden ser analizados de forma conjunta, dado que sus características magnéticas a temperatura ambiente no varían en exceso entre dichos tamaños. Se observa que, cuando los dopados con zinc son bajos, las magnetizaciones de saturación presentan unos valores notablemente más elevados que los de las MNPs no dopadas, mostrando además una tendencia levemente creciente a medida que se aumenta la presencia de zinc. Esta tendencia se rompe cuando la estequiometría de este elemento en los nanocubos excede un valor de aproximadamente 0.30, por encima del cual las saturaciones decaen de forma importante, excepción hecha de la muestra de composición $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$, que presenta una saturación elevada, similar a la de los dopados con baja proporción del elemento. Esta última muestra es la única que rompe de forma evidente el comportamiento antes descrito.

Los valores de los campos coercitivos, por su parte, tienden, como norma general, a ser mayores a medida que se incrementa la proporción de zinc. Nótese, sin embargo, que los valores medidos se encuentran en una franja estrecha de valores y, a su vez, también muy próximos a los valores de las muestras no dopadas de tamaños similares, de lo que se concluye que los dopados con zinc no tienen una gran influencia sobre esta magnitud. Algo muy similar ocurre con las magnetizaciones remanentes, que son progresivamente mayores a medida que se incrementa el contenido de zinc en las MNPs, pero siempre dentro de un rango de valores reducido (Figura 2.51).

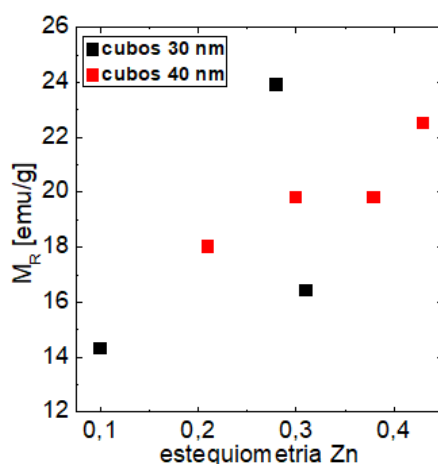


Figura 2.51: Representación gráfica de la magnetización remanente frente a la cantidad de zinc en los nanocubos dopados de 30 y 40 nm.

Como en el caso del cobalto, el origen del efecto del zinc sobre las características magnéticas de los nanocubos se encuentra en la localización de los átomos de zinc en la estructura de espinela de las ferritas. Los cationes de zinc se sitúan en las posiciones tetraédricas, dando lugar a una estructura de espinela normal². De este modo, al contrario de lo que sucedía en las MNPs sin dopar o dopadas con cobalto, la magnetización neta de los sistemas dopados con zinc no será debida únicamente a los cationes situados en las posiciones octaédricas, dado que la presencia de zinc rompe el efecto de cancelación entre la totalidad de los cationes Fe^{3+} situados en posiciones tetraédricas y octaédricas. Al sustituir parte del Fe^{3+} tetraédrico por zinc, la parte equivalente del Fe^{3+} octaédrico deja de sufrir el efecto de cancelación de su momento magnético, lo que se traduce en una contribución positiva a la magnetización neta que explica el incremento en las saturaciones a medida que se aumenta la proporción de zinc en la estructura de los nanocubos. Esto posibilita que en las muestras dopadas con zinc se alcanzasen magnetizaciones de saturación a temperatura ambiente superiores a 132 emu/g, notablemente superiores a los 110 emu/g medidos en MNPs de óxido de hierro puras (no dopadas) con similares características de morfología y tamaño. Por otra parte, el hecho de que exista una estequiometría de zinc por encima de la cual las magnetizaciones de saturación dejan de aumentar está de acuerdo con observaciones previas^{7,70}, y se asocia a dos factores relacionados con las características y la disposición de los átomos de zinc: en primer lugar, a medida que se aumenta la presencia de zinc se incrementa de forma sutil la anisotropía de la red cristalina y se pierde la simetría de

coordinación de la estructura, debido al muy elevado peso atómico de dicho elemento dopante⁶⁹, pudiendo llegar a resultar este fenómeno lo suficiente relevante como para que se produzca un decrecimiento de las magnetizaciones netas. Sin embargo, el motivo fundamental parece residir en que, al añadir importantes cantidades de zinc, resulta posible que una pequeña parte del mismo se disponga en las posiciones octaédricas, sustituyendo a parte de los cationes de Fe^{2+} , que tienen una contribución positiva fundamental en las magnetizaciones de las MNPs. Este descenso en las saturaciones a dopajes elevados con zinc tiene lugar, en el presente estudio, a estequiometrías ligeramente superiores a ca. 0.30, valor muy próximo al establecido como óptimo previamente^{7,70}. Dentro de este comportamiento descrito, la muestra de nanocubos de aproximadamente 40 nm de composición $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$ es la única que no lo sigue, mostrando una elevada saturación a pesar de la alta presencia de zinc, lo cual puede ser asociado, como en algunos sistemas estudiados en páginas previas, a pequeños fenómenos de agregación de las MNPs al ser secadas para su caracterización magnética.

Los campos coercitivos y las magnetizaciones remanentes, como se comentó anteriormente, se ven afectados muy levemente por la presencia de zinc, siendo similares a los de las MNPs cúbicas sin dopar. La muestra en la que estas magnitudes difieren de forma más importante, si bien no en exceso, es la de nanocubos de 27.1 nm y composición $\text{Zn}_{0.10}\text{Fe}_{2.90}\text{O}_4$, resultando probable que estas diferencias sean debidas al tamaño algo más pequeño de las MNPs y no a su grado de dopado. Se observa, asimismo, una ligera tendencia creciente de ambas magnitudes a medida que se incrementa el grado de dopaje, la cual puede ser asociada, al igual que sucedía en el caso de los dopajes con cobalto, a un aumento de la tensión estructural al sustituir el hierro por átomos de mayor peso atómico³⁶. Que las variaciones observadas sean más pequeñas se debe, en primer lugar, a que no se lograron grados de incorporación de zinc a la estructura de las NPs tan elevados como en el caso del cobalto y, fundamentalmente y como ya se ha comentado, el zinc se dispone en posiciones tetraédricas en la que los cationes están empaquetados de forma poco densa, por lo que dan lugar a menores variaciones en la anisotropía magnética⁷¹.

Por último, también se analizaron dos muestras modificadas con manganeso (Figura 2.52 y Tabla 2.15). Dada la dificultad de incorporar el manganeso a la estructura de los nanocubos sin que estos perdiesen su morfología y tamaño deseado sólo se consiguieron sintetizar estas dos muestras, de tamaño diferente pero con un grado de

dopaje prácticamente idéntico y pequeño. Por ello, es complicado llevar a cabo cualquier tipo de análisis detallado sobre la influencia del grado de sustitución del hierro por este elemento dopante.

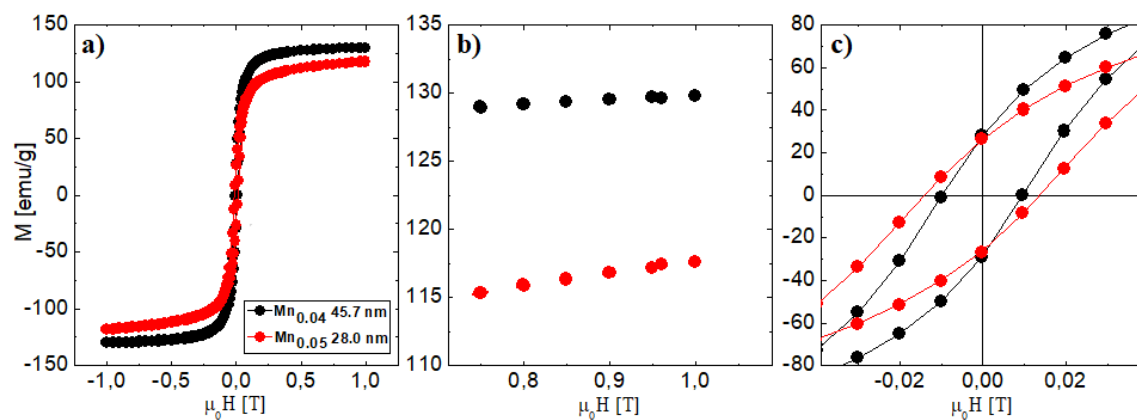


Figura 2.52: a) Curvas de magnetización frente al campo magnético aplicado a 300 K de los nanocubos dopados con manganeso. Imágenes ampliadas a campos magnético de b) alta intensidad y c) baja intensidad.

Tabla 2.15: Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos dopados con manganeso.

Composición	Tamaño [nm]	H_c [Oe]	M_s [emu/g]	M_R [emu/g]
$Mn_{0.05}Fe_{2.95}O_4$	45.7 ± 4.4	140.1	133.8	25.6
$Mn_{0.04}Fe_{2.96}O_4$	28.0 ± 3.1	96.0	117.6	28.5

A nivel estructural, el manganeso se dispone tanto en las posiciones octaédricas como en las tetraédricas de la estructura de espinela de las ferritas por lo que, a priori y en función del grado de dopaje, puede dar lugar a un efecto sobre los ciclos histéresis que combine, de forma menos brusca, los observados para los dopajes con zinc y cobalto, esto es, aumentos tanto en las saturaciones como en la anchura de los ciclos de histéresis³⁰. Esto se comprueba en las dos muestras sintetizadas, que presentan mayores magnetizaciones de saturación que las muestras sin dopar así como mayores remanencias y campos coercitivos. Los incrementos de estos últimos no son especialmente importantes, sobre todo si se comparan con los que se obtienen al dopar las MNPs con cobalto. En el caso de las saturaciones, sin embargo, sí llama la atención

la elevada magnetización de saturación de la muestra de composición $\text{Mn}_{0.05}\text{Fe}_{2.95}\text{O}_4$, superior a 133 emu/g, si bien en este caso, más que debido al grado de dopaje, probablemente deba ser atribuida a su tamaño especialmente elevado en comparación con las demás muestras estudiadas, cercano a 46 nm. La ausencia de un rango más elevado de estequiometrías y de un mayor número de muestras impide profundizar más en el análisis del efecto de los dopajes con este elemento.

En resumen, en este apartado se caracterizaron magnéticamente varios de los nanocubos cuya síntesis y estudio estructural se detalló en las primeras secciones del presente Capítulo. Dicha caracterización se llevó a cabo mediante medidas de los ciclos de histéresis de las diferentes muestras y, en algunos casos, de sus curvas FC y ZFC. Todos los sistemas mostraron unos ciclos de histéresis de área no nula a temperatura ambiente, si bien en algunos casos esta era muy reducida. Este fenómeno se asocia a un comportamiento débilmente ferrimagnético, el cual es esperado dado el tamaño de las MNPs sintetizadas que, como norma general, se situaba ligeramente por encima del tamaño de transición del régimen superparamagnético. Asimismo, se estudió la influencia de la temperatura y del tamaño de las MNPs cúbicas sobre sus ciclos de histéresis, concluyendo que a medida que se aumenta la longitud de arista de los nanocubos estos presentan unas saturaciones, unas remanencias y unos campos coercitivos progresivamente más elevados, fenómeno que también ocurre a medida que se disminuye la temperatura. Se estudiaron también las MNPs con otras geometrías que se obtuvieron variando diferentes parámetros del proceso sintético, demostrándose que la mayor anisotropía morfológica de estas daba lugar a menores magnetizaciones de saturación que las medidas en nanocubos de similares tamaños. Por último, se analizaron los efectos de los dopajes con tres elementos metálicos (cobalto, zinc y manganeso) sobre las magnitudes características de los ciclos de histéresis de los nanocubos, concluyendo que las presencias de cobalto y zinc, esta última dentro de un rango óptimo, contribuyen de forma significativa al incremento de los campos coercitivos y de las magnetizaciones de saturación, respectivamente. El efecto del manganeso no pudo ser analizado de forma tan exhaustiva dada la dificultad de sintetizar muestras que incorporasen este elemento en su estructura sin perder las características de tamaño y morfología deseadas.

2.3. Bibliografía

1. Pardo, A. *et al.* Analysis of the influence of synthetic parameters on the structure and physico-chemical properties of non-spherical iron oxide nanocrystals and their biological stability and compatibility. *Dalt. Trans.* **45**, 797–810 (2015).
2. Liang, X. *et al.* The valence and site occupancy of substituting metals in magnetite spinel structure $\text{Fe}_{3-x}\text{M}_x\text{O}_4$ ($\text{M} = \text{Cr}, \text{Mn}, \text{Co}$ and Ni) and their influence on thermal stability. *Solid State Sci.* **15**, 115–122 (2013).
3. Kafrouni, L. & Savadogo, O. Recent progress on magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Prog. Biomater.* **5**, 147–160 (2016).
4. Mohammed, L., Gomaa, H. G., Ragab, D. & Zhu, J. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology* **30**, 1–14 (2017).
5. Salazar-Alvarez, G. *et al.* Cubic versus spherical magnetic nanoparticles: The role of surface anisotropy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13234–13239 (2008).
6. Guardia, P., Labarta, A. & Batlle, X. Tuning the size, the shape, and the magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **115**, 390–396 (2011).
7. Noh, S. H. *et al.* Nanoscale magnetism control via surface and exchange anisotropy for optimized ferrimagnetic hysteresis. *Nano Lett.* **12**, 3716–3721 (2012).
8. Alborzi, Z., Hassanzadeh, A. & Golzan, M. M. Superparamagnetic Behavior of the Magnetic Hysteresis Loop. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol* **8**, 93–98 (2012).
9. Liu, Z. L. *et al.* Synthesis and magnetic properties of Fe_3O_4 nanoparticles. *J. Mater. Synth. Process.* **10**, 83–87 (2002).
10. Leslie-Pelecky, D. L. & Rieke, R. D. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chem. Mater.* **8**, 1770–1783 (1996).
11. Gas, P. & Miaskowski, A. Specifying the ferrofluid parameters important from the viewpoint of magnetic fluid hyperthermia. in *2015 Selected Problems of Electrical Engineering and Electronics, WZEE 2015* 1–6 (IEEE, 2016).

doi:10.1109/WZEE.2015.7394040

12. Kita, E. *et al.* Ferromagnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia and thermoablation therapy. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **43**, 474011 (2010).
13. Hühn, J. *et al.* Selected standard protocols for the synthesis, phase transfer, and characterization of inorganic colloidal nanoparticles. *Chem. Mater.* **29**, 399–461 (2017).
14. Ling, D., Lee, N. & Hyeon, T. Chemical synthesis and assembly of uniformly sized iron oxide nanoparticles for medical applications. *Acc. Chem. Res.* **48**, 1276–1285 (2015).
15. Kim, D. *et al.* Synthesis of uniform ferrimagnetic magnetite nanocubes. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 454–455 (2009).
16. Cabrera, L. I., Somoza, Á., Marco, J. F., Serna, C. J. & Puerto Morales, M. Synthesis and surface modification of uniform MFe_2O_4 ($M = Fe, Mn, \text{ and } Co$) nanoparticles with tunable sizes and functionalities. *J. Nanoparticle Res.* **14**, 873 (2012).
17. Mejías, R. *et al.* Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials* **32**, 2938–2952 (2011).
18. Sze, A., Erickson, D., Ren, L. & Li, D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *J. Colloid Interface Sci.* **261**, 402–410 (2003).
19. Liao, H. G., Cui, L., Whitlam, S. & Zheng, H. Real-time imaging of Pt_3Fe nanorod growth in solution. *Science (80-.)*. **336**, 1011–1014 (2012).
20. McKeehan, L. W. Physical theory of ferromagnetic domains [37]. *Phys. Rev.* **79**, 745 (1950).
21. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. & Kim, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 023501 (2015).

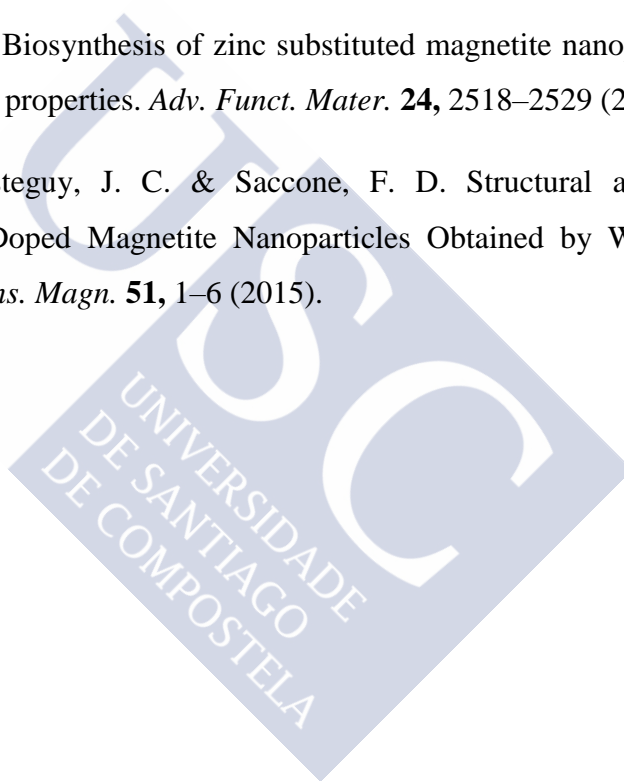
22. Shavel, A., Rodríguez-González, B., Spasova, M., Farle, M. & Liz-Marzán, L. M. Synthesis and characterization of iron/iron oxide core/shell nanocubes. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 3870–3876 (2007).
23. Nadi, L. M. *Modern Trends in Physics Research*. (WORLD SCIENTIFIC, 2013). doi:10.1142/8796
24. Kittel, C. *Introduction to solid state physics*. (1916).
25. Wang, Z. L. Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. *J. Phys. Chem. B* **104**, 1153–1175 (2000).
26. Khaleel, A. A. Nanostructured Pure ψ -Fe₂O₃ via Forced Precipitation in an Organic Solvent. *Chem. - A Eur. J.* **10**, 925–932 (2004).
27. Song, Q. & Zhang, Z. J. Shape Control and Associated Magnetic Properties of Spinel Cobalt Ferrite Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6164–6168 (2004).
28. Kovalenko, M. V. *et al.* Fatty acid salts as stabilizers in size- and shape-controlled nanocrystal synthesis: The case of inverse spinel iron oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6352–6353 (2007).
29. Guardia, P., Pérez-Juste, J., Labarta, A., Batlle, X. & Liz-Marzán, L. M. Heating rate influence on the synthesis of iron oxide nanoparticles: The case of decanoic acid. *Chem. Commun.* **46**, 6108–6110 (2010).
30. Yelenich, O. V., Solopan, S. O., Trachevskii, V. V. & Belous, A. G. Synthesis and properties of AFe₂O₄ (A = Mn, Fe, Co, Ni, Zn) nanoparticles produced by deposition from diethylene glycol solution. *Russ. J. Inorg. Chem.* **58**, 901–905 (2013).
31. Sun, S. & Zeng, H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8204–8205 (2002).
32. Guardia, P. *et al.* Water-soluble iron oxide nanocubes with high values of specific absorption rate for cancer cell hyperthermia treatment. *ACS Nano* **6**, 3080–3091 (2012).
33. Goniakowski, J., Finocchi, F. & Noguera, C. Polarity of oxide surfaces and

- p nanostructures.
- Reports Prog. Phys.*
- 71**
- , 016501 (2008).
34. Swaminathan, R., Nuhfer, N. T. & McHenry, M. E. 3-dimensional Morphologies of Truncated Ferrite Nanoparticles. *Microsc. Microanal.* **11**, 2004–2005 (2005).
 35. Huda, N. SPINELS (Normal or Inverse) - All about Chemistry. (2016). Available at: <http://www.chemohollic.com/2016/07/spinels-normal-or-inverse.html>.
 36. Atomic Radius of the elements. Atomic Radius for all the elements in the Periodic Table. *Atomic Radius of the elements* Available at: <http://periodictable.com/Properties/A/AtomicRadius.v.html>. (Accessed: 28th August 2018)
 37. Serantes, D. & Baldomir, D. Superparamagnetism and Monte Carlo simulations. *Open Surf. Sci. J.* **4**, 71 (2012).
 38. Jiang, J., Oberdörster, G. & Biswas, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanoparticle Res.* **11**, 77–89 (2009).
 39. Stetefeld, J., McKenna, S. A. & Patel, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys. Rev.* **8**, 409–427 (2016).
 40. Zhang, Q. *et al.* Model Driven Optimization of Magnetic Anisotropy of Exchange-Coupled Core-Shell Ferrite Nanoparticles for Maximal Hysteretic Loss. *Chem. Mater.* **27**, 7380–7387 (2015).
 41. Schweiger, C. *et al.* Quantification of the internalization patterns of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with opposite charge. *J. Nanobiotechnology* **10**, 28 (2012).
 42. Barra, G. M. O., Crespo, J. S., Bertolino, J. R., Soldi, V. & Nunes Pires, A. T. Maleic Anhydride Grafting on EPDM: Qualitative and Quantitative Determination. *J. Braz. Chem. Soc.* **10**, 31–34 (1999).
 43. Lisperguer, J., Nuñez, C. & Perez-Guerrero, P. Structure and thermal properties of maleated lignin-recycled polystyrene composites. *J. Chil. Chem. Soc.* **58**, 1937–1940 (2013).

44. Pelaz, B. *et al.* Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: Anticipating adverse nano-bio interactions. *Small* **9**, 1573–1584 (2013).
45. Marques, M. R. C., Loebenberg, R. & Almukainzi, M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol.* **18**, 15–28 (2011).
46. Lynch, I. & Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **3**, 40–47 (2008).
47. Grootveld, M. & Halliwell, B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of free-radical reactions in vivo? *Biochem. J.* **243**, 803–8 (1987).
48. Ruiz, A. *et al.* Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid: development, characterization, and application in biomedicine. *J. Nanoparticle Res.* **16**, 2589 (2014).
49. Gupta, R. & Gupta, K. C. Synthesis, IR spectral studies and antimicrobial studies of some rare earth metal complexes with meso 2,3-dimercaptosuccinic acid. *Natl. Acad. Sci. Lett.* **35**, 249–252 (2012).
50. López-Cruz, A., Barrera, C., Calero-Ddelc, V. L. & Rinaldi, C. Water dispersible iron oxide nanoparticles coated with covalently linked chitosan. *J. Mater. Chem.* **19**, 6870–6876 (2009).
51. Sathya, A. *et al.* CoxFe₃-xO₄Nanocubes for Theranostic Applications: Effect of Cobalt Content and Particle Size. *Chem. Mater.* **28**, 1769–1780 (2016).
52. Yu, Y., Tauxe, L. & Moskowitz, B. M. Temperature dependence of magnetic hysteresis. *Geochemistry, Geophys. Geosystems* **5**, (2004).
53. Guardia, P. *et al.* One pot synthesis of monodisperse water soluble iron oxide nanocrystals with high values of the specific absorption rate. *J. Mater. Chem. B* **2**, 4426–4434 (2014).
54. Muxworthy, A. R. & Williams, W. Critical superparamagnetic/single-domain grain sizes in interacting magnetite particles: Implications for magnetosome crystals. *J. R. Soc. Interface* **6**, 1207–1212 (2009).

55. Hansen, M. F. & Mørup, S. Estimation of blocking temperatures from ZFC/FC curves. *J. Magn. Magn. Mater.* **203**, 214–216 (1999).
56. Caruntu, D., Caruntu, G. & O'Connor, C. J. Magnetic properties of variable-sized Fe₃O₄ nanoparticles synthesized from non-aqueous homogeneous solutions of polyols. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **40**, 5801–5809 (2007).
57. Cullity, B. D. & Graham, C. D. *Introduction to Magnetic Materials, Second Edition, Chapter 7 on Magnetic Anisotropy.* (2009).
58. Wang, J., Zhang, K., Peng, Z. & Chen, Q. Magnetic properties improvement in Fe₃O₄ nanoparticles grown under magnetic fields. *J. Cryst. Growth* **266**, 500–504 (2004).
59. Shea, J. J. *Modern magnetic materials - principles and applications [Book Review]. IEEE Electrical Insulation Magazine* **21**, (Wiley, 2005).
60. Li, Q. *et al.* Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles. *Sci. Rep.* **7**, 9894 (2017).
61. Dunlop, D. J. Hysteresis properties of magnetite and their dependence on particle size: A test of pseudo-single-domain remanence models. *J. Geophys. Res.* **91**, 9569 (1986).
62. Ni, X., Zheng, Z., Xiao, X., Huang, L. & He, L. Silica-coated iron nanoparticles: Shape-controlled synthesis, magnetism and microwave absorption properties. *Mater. Chem. Phys.* **120**, 206–212 (2010).
63. Materia, M. E. *et al.* Mesoscale assemblies of iron oxide nanocubes as heat mediators and image contrast agents. *Langmuir* **31**, 808–816 (2015).
64. Szotek, Z. *et al.* Electronic structures of normal and inverse spinel ferrites from first principles. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **74**, 174431 (2006).
65. Cornell, R. M. & Schwertmann, U. *The Iron Oxides.* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/3527602097
66. Kimling, J. *Magnetization Reversal in Cylindrical Nanowires and in Nanowires with Perpendicular Magnetic Anisotropy.* (2013).

67. Fantechi, E., Innocenti, C., Albino, M., Lottini, E. & Sangregorio, C. Influence of cobalt doping on the hyperthermic efficiency of magnetite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **380**, 365–371 (2015).
68. Hocheplied, J. F. & Pileni, M. P. Magnetic properties of mixed cobalt-zinc ferrite nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **87**, 2472–2478 (2000).
69. Lenntech, A., Internships, I. & Mass, A. Chemical elements of the periodic table sorted by Atomic Mass. 16–18 (2014). Available at: <https://www.lenntech.com/periodic/mass/atomic-mass.htm>. (Accessed: 5th September 2018)
70. Byrne, J. M. *et al.* Biosynthesis of zinc substituted magnetite nanoparticles with enhanced magnetic properties. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 2518–2529 (2014).
71. Ferrari, S., Apesteguy, J. C. & Saccone, F. D. Structural and Magnetic Properties of Zn-Doped Magnetite Nanoparticles Obtained by Wet Chemical Method. *IEEE Trans. Magn.* **51**, 1–6 (2015).



3. Nanopartículas magnéticas de forma esférica y estructuras magnéticas núcleo-coraza

En este capítulo se abordarán la síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas (MNPs) basadas en óxidos de hierro de simetría esférica con diferentes tamaños, composiciones (dopadas con distintos elementos metálicos como zinc, cobalto o manganeso), y/o estructura (simple o núcleo-coraza, usando las primeras como núcleos). Se realizará un análisis detallado de las propiedades físicas de todas las MNPs obtenidas, prestando especial atención a la influencia que puedan tener sobre sus características magnéticas la inclusión en su estructura de diferentes elementos dopantes, claves de cara a sus potenciales aplicaciones biomédicas en campos como la hipertermia magnética^{1,2} (MFH) o la imagen por resonancia magnética^{3,4} (MRI). Se sintetizarán MNPs de tamaño reducido, con un diámetro inferior a ca. 20 nm en todos los casos, de forma que estas presentarán un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente⁵. En este régimen, como se ha explicado en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, las MNPs tienen unas características adecuadas para su uso en el ámbito biomédico debido a su escasa tendencia a la agregación bajo un campo magnético externo aplicado como consecuencia de su baja magnetización remanente^{4,6}. Asimismo, la elevada relación superficie/volumen de estos nanosistemas los hace candidatos ideales para su implementación en otras aplicaciones tecnológicas como, por ejemplo, la eliminación de metales pesados de medio acuoso por adsorción^{7,8}.

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Materiales

Los reactivos necesarios para la síntesis de las diferentes MNPs fueron: acetilacetatonatos de hierro (III) (pureza 99%), cobalto (II) (97%), manganeso (II) (99%) y zinc (II) (97%) como compuestos precursores de los elementos metálicos que forman parte de la estructura de las MNPs, 1,2-hexadecanediol (90%) como agente reductor, ácido oleico (90%) y oleilamina (70%) como agentes surfactantes y éter bencílico

(99%) como disolvente en el que llevar a cabo la reacción de descomposición térmica. Para efectuar la transferencia a medio acuoso de las MNPs mediante su recubrimiento polimérico se emplearon poli(isobutileno-anhídrido maleico) (PMA) $M_w=6000$ Da, dodecilamina (98%), tetrahidrofurano (THF) (99.9%) y cloroformo (98%). Todos los reactivos anteriores fueron adquiridos en la casa *Sigma-Aldrich* y usados sin purificación extra. Para los ensayos de estabilidad en medio biológico se utilizaron medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suero fetal bovino (FBS), L-glutamina, y penicilina/estreptomicina, suministrados por *Invitrogen*, así como cloruro de sodio (99.9%) sulfato de sodio (99%), cloruro de calcio (96%), glicina (98%), fosfato de sodio dibásico (98%) y ftalato de potasio (99%) (componentes del medio fagolisosomal) que fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich*.

3.1.2. Síntesis

Las síntesis de las MNPs de forma esférica y de las estructuras núcleo-coraza se llevaron a cabo mediante descomposición térmica que, como se comentó en capítulos anteriores, es la técnica que da lugar a unos sistemas con un mayor grado de monodispersidad. Se utilizó un reactor de 100 ml de volumen de tres bocas conectado a un condensador de reflujo de agua y a una línea Schlenk estándar, con el fin de generar ambientes inertes o de presión reducida en el interior del recipiente⁹. Este reactor se colocó sobre una manta calefactora para suministrar calor y controlar la temperatura de la reacción, empleándose agitación magnética durante el proceso sintético (Figura 3.1).

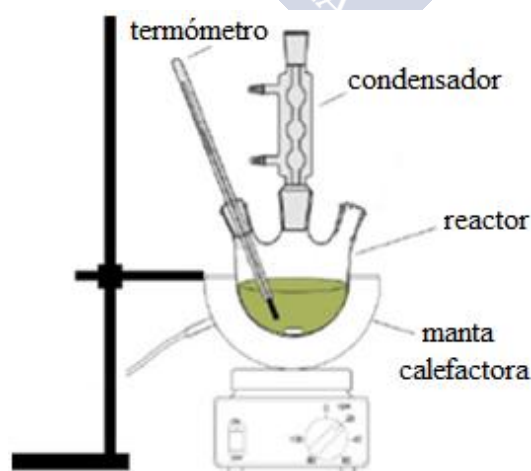


Figura 3.1: Esquema del montaje experimental empleado para la síntesis de MNPs esféricas y de nanoestructuras núcleo-coraza.

I. MNPs de forma esférica

En una síntesis típica de MNPs esféricas de óxido de hierro con un diámetro aproximado de 8.50 nm, 1.059 g de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (3 mmol) se mezclan con 1.695 g de ácido oleico (6 mmol), 1.605 g de oleilamina (6 mmol) y 2.585 g de 1,2-hexadecanediol (10 mmol) en 20 ml de éter bencílico, obteniéndose una disolución de color marrón oscuro. Después de introducir la disolución en un baño de ultrasonidos durante 2 min., esta se vierte en el reactor y se inicia la agitación magnética a una velocidad de 700 rpm. La temperatura de la disolución se incrementa a 110 °C y, una vez alcanzada, se aplica un vacío primario de 10 mbar durante 60 min. Posteriormente, se sustituye el vacío por un flujo de nitrógeno a través de la línea Schlenk y se eleva la temperatura a 210 °C, a una velocidad de calentamiento de 8 °C/min y manteniéndose esta durante 120 min. Finalmente, se incrementa la temperatura de la disolución de reacción hasta los 295 °C a una velocidad de 5 °C/min, manteniéndose el sistema bajo reflujo durante otros 60 min. (Figura 3.2) durante los cuales la disolución adquiere un color negro intenso^{10,11}.

II. MNPs con estructura núcleo-coraza

Por su parte, en una síntesis típica de nanoestructuras núcleo-coraza con núcleos de óxido de hierro dopados con cobalto de 7.50 nm de diámetro y corazas de óxido de hierro dopadas con manganeso de 3.50 nm de espesor (Co@MnMNPs), 0.706 g de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (2 mmol) y 0.253 g de $\text{Mn}(\text{acac})_2$ (1 mmol) se mezclan con 0.565 g de ácido oleico (2 mmol), 0.535 g de oleilamina (2 mmol) y 2.585 g de 1,2-hexadecanediol (10 mmol) en 20 ml de éter bencílico, obteniéndose una disolución de color marrón oscuro. Después de introducir la disolución en un baño de ultrasonidos durante 2 min., esta se vierte en el reactor y se inicia la agitación magnética a una velocidad de 700 rpm. La temperatura del sistema se incrementa a 110 °C y, una vez alcanzada, se inyectan 30 mg de MNPs de óxido de cobalto de 7.50 nm de tamaño dispersas en 2 ml de cloroformo. A continuación, se aplica un vacío primario de 10 mbar durante 60 min. para, posteriormente, sustituir el vacío por un flujo de nitrógeno a través de la línea Schlenk y elevar la temperatura a 210 °C a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min. La disolución se mantiene a 210 °C durante 60 min. y, finalmente, se aumenta la temperatura hasta 300 °C a la misma velocidad de calentamiento (3 °C/min)

manteniendo la reacción a esta temperatura y bajo reflujo durante 30 min. (Figura 3.2), durante los cuales la disolución adquiere un color negro intenso^{9,11}.

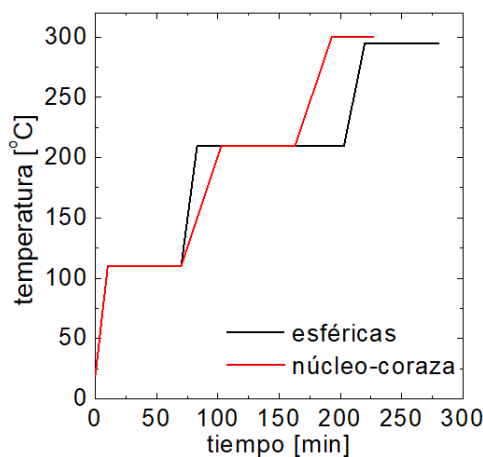


Figura 3.2: Perfiles de calentamiento en las síntesis típicas de MNPs esféricas y nanoestructuras núcleo-coraza.

En ambos tipos de nanosistemas el proceso de lavado de las MNPs sintetizadas se lleva a cabo de forma similar: después de dejar enfriar el sistema hasta temperatura ambiente bajo agitación durante aproximadamente 2 h, se añaden al reactor 50 ml de etanol; la disolución resultante se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min. obteniéndose un precipitado de color negro. El sobrenadante se retira y el material precipitado se dispersa en 20 ml de tolueno con 0.05 ml de ácido oleico y 0.05 ml de oleilamina, introduciéndose en el baño de ultrasonidos durante 10 min. Esta nueva disolución se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min. a fin de eliminar posibles agregados de MNPs, descartándose el material precipitado. Al sobrenadante resultante se le añaden 50 ml de etanol y se centrifuga de nuevo a 4000 rpm durante 10 min., formándose un nuevo precipitado de color negro que se redispersa en hexano de cara a la caracterización de las MNPs mediante TEM.

Mediante la sustitución parcial del $\text{Fe}(\text{acac})_3$ por los precursores de otros elementos como manganeso, cobalto o zinc se sintetizaron MNPs esféricas de diferentes composiciones, mientras que variando parámetros como el ritmo de incremento de temperatura o la concentración global de dichos precursores metálicos se lograron sistemas de diferentes tamaños. Por su parte, en las MNPs con estructura núcleo-coraza se estudiaron diferentes tamaños y composiciones en cada una de las partes de la

estructura dual, siendo el espesor de las corazas modificado mediante variaciones en las cantidades de núcleos añadidas en el proceso sintético.

3.1.3. Transferencia de los sistemas a medio acuoso

Las MNPs resultantes de las reacciones de descomposición térmica antes descritas presentaban un recubrimiento de ácido oleico y oleilamina, dos compuestos altamente hidrófobos que hacen que estas partículas sólo fuesen estables en disolventes orgánicos de muy baja polaridad tales como, por ejemplo, cloroformo o hexano. De cara a sus potenciales aplicaciones biomédicas es necesario modificar la cubierta de las MNPs de forma que sean estables en medio acuoso previniendo, además, que este proceso no provoque ni su aglomeración ni la modificación de sus propiedades físicas¹².

El proceso de transferencia de fase de las MNPs se llevó a cabo mediante su recubrimiento con el polímero PMA (peso molecular $6000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 39 monómeros por cadena polimérica en promedio) modificado con dodecilamina en un 75%¹³. Para preparar este compuesto, 3.084 g de PMA (20 mmol de monómeros) se mezclan con 2.780 g de dodecilamina (15 mmol) en 100 ml de THF, dando lugar a una disolución de color amarillo intenso. A continuación, bajo agitación magnética, la temperatura del sistema se incrementa a 70°C y se mantiene a reflujo durante toda una noche, tornando el color de la disolución a un tono mucho más transparente al cabo de unos minutos. Finalmente, se enfría la disolución polimérica durante unos minutos y el disolvente es evaporado en un rotavapor hasta que el polímero modificado, con un color amarillo tenue, se encuentre completamente seco. A continuación, este se dispersa en 25 ml de cloroformo dando lugar a una disolución con una concentración monomérica de 0.80 M.

El recubrimiento polimérico se efectúa mezclando una disolución de las MNPs en cloroformo con la disolución de PMA-dodecilamina (también en cloroformo), de forma que variando los volúmenes añadidos de cada disolución precursora se puede controlar la cantidad de monómeros de PMA por cada nm^2 de superficie de las MNPs disponible¹⁴. Los volúmenes a añadir se calculan siguiendo la ecuación 3.1:

$$V_{PMA} = \frac{6 \cdot 10^{21} \cdot C_{NP} \cdot V_{NP} \cdot X}{N_A \cdot C_{PMA} \cdot \rho_{NP} \cdot D_{NP}} \quad (3.1)$$

siendo V_{PMA} el volumen de la disolución de PMA-dodecilamina en cloroformo [ml], C_{NP} la concentración de la disolución de MNPs en cloroformo [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$], V_{NP} el volumen de la disolución de MNPs en cloroformo [ml], X el número de monómeros deseados por nm^2 de superficie de MNPs [nm^{-2}], N_A el número de Avogadro [$6.02\cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$], C_{PMA} la concentración de la disolución de PMA en cloroformo [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$], ρ_{NP} la densidad de las MNPs [$\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] y D_{NP} el diámetro de las MNPs [nm].

La cantidad de monómeros de PMA por nm^2 de superficie de MNPs necesarios para que estas últimas sean estables, en función de su tamaño, fue determinada experimentalmente y se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Densidad superficial de monómeros de PMA que se necesita implementar en el proceso de funcionalización para que las MNPs sean estables en función de su tamaño.

Diámetro MNPs [nm]	Densidad de monómeros de PMA [nm^{-2}]
7 – 10	400
10 – 13	500
13 – 16	600
16 – 19	700
19 – 22	800

Una vez efectuada la mezcla de las MNPs con el polímero, esta se introduce en el baño de ultrasonidos durante 30 s y, a continuación, el disolvente se elimina lentamente con un rotavapor, tomando el proceso de evaporación un tiempo de entre 30 y 40 min. bajo condiciones de temperatura y presión de 45 °C y 450 mbar. Posteriormente, se añade un volumen de 50 ml de cloroformo y se repite el proceso de evaporación dos veces más, con el objetivo de maximizar la cantidad de polímero modificado que se une a la superficie del sistema magnético. Tras la última evaporación, se añaden 50 ml de una disolución tampón SBB12 (concentración de 50 mM de borato de sodio en agua, pH 12) a las MNPs secas y se agitan durante 30 min a 45 °C a fin de favorecer la transferencia de las MNPs al medio acuoso. Finalmente, las MNPs son recolectadas del medio SBB12 mediante centrifugación a 4000 rpm en tubos

con filtros de 100 KDa de corte de membrana y disueltas en agua miliQ. De cara a eliminar el posible exceso de polímero presente, las disoluciones acuosas de MNPs son centrifugadas adicionalmente 3 veces a 15000 rpm durante 2 h añadiendo previamente un 25% de etanol, que favorece la precipitación de las MNPs permaneciendo el exceso polimérico en el sobrenadante.

3.1.4. Análisis del nivel de recubrimiento, agregación y estabilidad coloidal de las MNPs

Tras el proceso de recubrimiento polimérico, se estudiaron los grados de agregación de los sistemas funcionalizados a través de medidas del tamaño hidrodinámico de las MNPs, efectuadas mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Asimismo, mediante la técnica de velocimetría Doppler, también se midieron las movilidades electroforéticas en todos los sistemas de partículas. A partir de estas, aplicando la ecuación de Smoluchowsky¹⁵, se determinaron sus potenciales zeta (ζ), a fin de comprobar el correcto recubrimiento con el polímero de las diferentes MNPs.

Se estudió, por último, la estabilidad de los diferentes sistemas nanoparticulados en varios medios biológicos de diferente complejidad, durante un periodo de 96 h, mediante medidas periódicas del tamaño hidrodinámico de las MNPs. Los medios estudiados fueron:

- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4.
- DMEM con L-glutamina (1%).
- DMEM con L-glutamina (1%) y penicilina/estreptomicina (1%).
- DMEM con L-glutamina (1%), penicilina/estreptomicina (1%) y FBS (10%).
- Disoluciones cloruro de sodio (NaCl) en agua de distintas concentraciones entre 0.01 M y 2.50 M.
- Medio fagolisosomal (PSF) pH 4.5. Composición: glicina ($0.059 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), cloruro de sodio ($3.21 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), sulfato de sodio ($0.039 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), cloruro de calcio ($0.128 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), fosfato de sodio dibásico ($0.071 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) y ftalato de potasio ($0.110 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) en agua.

3.1.5. Técnicas de caracterización

Para determinar la forma y el tamaño de las MNPs obtenidas se obtuvieron imágenes de TEM utilizando un microscopio electrónico de transmisión modelo *Phillips CM-12* operando con un voltaje de aceleración de 120 kV en un rango de 100000 a 500000X. La preparación de las muestras se llevó a cabo depositando un volumen de 10 μl de las disoluciones de MNPs, previamente diluidas hasta alcanzar un color marrón muy tenue, sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono que, posteriormente, se secó bajo condiciones ambientales durante 2 h.

Las medidas de difracción de rayos X de polvo cristalino se efectuaron con un difractómetro *Phillips* manejado con una unidad de control modelo *PW1710*, un goniómetro vertical modelo *PW1820/00* y un generador modelo *Enraf Nonius FR590*, operado a 40 kV y 30 mA. Los rayos X se obtuvieron de un tubo sellado de cobre y la radiación fue monocromatizada con un monocromador de grafito. La detección de rayos X efectuó con un detector de área tipo *Pan Analytical PIXcel-3*. Los difractogramas se midieron en el rango angular 10° - 70° con un ángulo de paso de 0.02° y un tiempo de paso de 2 s. Para efectuar las medidas de difracción de rayos X las muestras fueron precipitadas mediante centrifugación y secadas durante 24 h bajo unas condiciones de temperatura y presión de 60°C y 100 mbar, respectivamente.

La composición y concentración de las disoluciones de MNPs se determinaron mediante espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El equipo utilizado fue un ICP-MS modelo *Agilent 7700x* con sistema de introducción de muestras formado por un nebulizador *Micromist glass slow-flow*, una cámara de spray de vidrio de doble paso con sistema Peltier y una antorcha de cuarzo, trabajando con una potencia de 1550 W y un flujo de plasma de $15\text{ dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$. Para la preparación de las muestras, 20 μl de las disoluciones originales fueron digeridos en 480 μl de una mezcla 75:25 (v/v) de ácido clorhídrico y ácido nítrico (agua regia) durante 2 h. Posteriormente, se añadieron 4.5 ml de ácido nítrico en agua al 1% (v/v), compuesto que sirve para neutralizar el agua regia y que actúa como agente de limpieza ante la presencia de trazas de iones metálicos de medidas previas presentes en los conductos del sistema de nebulización del equipo.

El tamaño hidrodinámico y el potencial ζ de las MNPS preparadas fueron determinados por DLS y velocimetría Doppler, respectivamente, usando un *Nano ZS*

(*Nanosseries, Malvern Instruments*). Para la preparación de las muestras, las MNPs fueron diluidas en agua y en otros medios biológicos hasta que los sistemas tomaron un color marrón muy tenue. Se realizaron para cada uno de los sistemas estudiados tres medidas independientes de tamaño hidrodinámico y de la movilidad electroforética, a partir de la cual se determinó el potencial ζ .

La caracterización magnética fue llevada a cabo en un magnetómetro SQUID (*Quantum Design MPMS5, San Diego, CA*). Las curvas de magnetización de las muestras estudiadas se midieron desde -70000 Oe a +70000 Oe a temperaturas de 10 K y 300 K, registrando los datos en los intervalos indicados en la Tabla 3.2. Las curvas de enfriamiento en ausencia y presencia de campo magnético (ZFC y FC) se midieron desde 300 K hasta 10 K, la segunda de ellas bajo un campo aplicado de 1000 Oe, registrando la magnetización en saltos de 10 K. La preparación de las muestras para las medidas en el magnetómetro se efectuó de la siguiente forma: un volumen de aproximadamente 50-100 μl de una disolución de las MNPs en agua (de concentración previamente determinada mediante ICP-MS) fue vertido gota a gota sobre un trozo de papel de filtro de aproximadamente $1 \times 3 \text{ cm}^2$. Este papel de filtro absorbió el disolvente muy rápidamente y, a continuación, fue secado en un horno a 60 °C durante 90 min. Finalmente, el trozo de papel se colocó en el interior de la cápsula plástica que fue introducida en el magnetómetro SQUID para obtener las características magnéticas del sistema en cuestión.

Tabla 3.2: Protocolo de variación del campo magnético para la obtención de los ciclos de histéresis de los sistemas de MNPs (1 T = 10000 Oe).

	\vec{B}_{inic} [T]	\vec{B}_{fin} [T]	$\Delta\vec{B}$ [T]
Etapas 1	7.0	2.0	-0.50
Etapas 2	2.0	0.4	-0.20
Etapas 3	0.4	0.1	-0.05
Etapas 4	0.1	-0.1	-0.01
Etapas 5	-0.1	-0.4	-0.05
Etapas 6	-0.4	-2.0	-0.20
Etapas 7	-2.0	-7.0	-0.50
	\vec{B}_{inic} [T]	\vec{B}_{fin} [T]	$\Delta\vec{B}$ [T]
Etapas 8	-7.0	-2.0	+0.50
Etapas 9	-2.0	-0.4	+0.20
Etapas 10	-0.4	-0.1	+0.05
Etapas 11	-0.1	0.1	+0.01
Etapas 12	0.1	0.4	+0.05
Etapas 13	0.4	2.0	+0.20
Etapas 14	2.0	7.0	+0.50

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Influencia de las condiciones sintéticas y caracterización estructural de las MNPs de forma esférica

Se efectuaron diversas síntesis basadas en la descomposición térmica de diferentes precursores metálicos en forma de acetilacetonatos ($\text{Fe}(\text{acac})_3$, $\text{Mn}(\text{acac})_2$, $\text{Zn}(\text{acac})_2$ y $\text{Co}(\text{acac})_2$) en el seno de un disolvente de alto punto de ebullición (éter bencílico) y en presencia de compuestos reductores (1,2-hexadecanediol) y surfactantes-estabilizantes (ácido oleico y oleilamina). Mediante variaciones en las razones entre estos elementos y en las condiciones de las reacciones se lograron sintetizar MNPs de distintas características físico-químicas¹⁶.

Así, en una síntesis típica como la descrita en la sección de Materiales y Métodos, se obtienen MNPs de óxido de hierro de morfología esférica con un diámetro de ca. 8.80 nm. Las MNPs logradas son altamente monodispersas, con una distribución de tamaños muy estrecha y con un grado de agregación prácticamente nulo (Figura 3.3a-b). Su estructura cristalina fue determinada mediante la técnica de difracción de rayos X (Figura 3.3c), obteniéndose un patrón cuyos picos indican que la fase cristalina predominante es la magnetita, Fe_3O_4 (Figura 3.3d). Nótese que los espectros de difracción de rayos X de la estructura de magnetita y maghemita son muy similares, con los picos de mayor tamaño en posiciones idénticas, pero la ausencia de ciertos picos menores característicos de la estructura maghemita indica que la estructura de las MNPs sintetizadas es principalmente Fe_3O_4 ¹⁷. Por otra parte, resulta evidente la diferencia de contraste que se observa entre distintas MNPs en las imágenes de TEM, apareciendo unas con un color mucho más oscuro que otras. Como se ha explicado en capítulos previos, este efecto puede ser debido a diferentes causas: i) la existencia de MNPs de composición no uniforme, previsiblemente con una mayoría de óxido de hierro y pequeñas partes de hierro metálico; ii) la presencia de MNPs parcialmente oxidadas debido a los procesos de lavado, que fueron efectuados en ausencia de atmósfera inerte; o iii) simplemente a la posición de las MNPs, que pueden encontrarse orientadas según diferentes planos cristalográficos¹⁸.

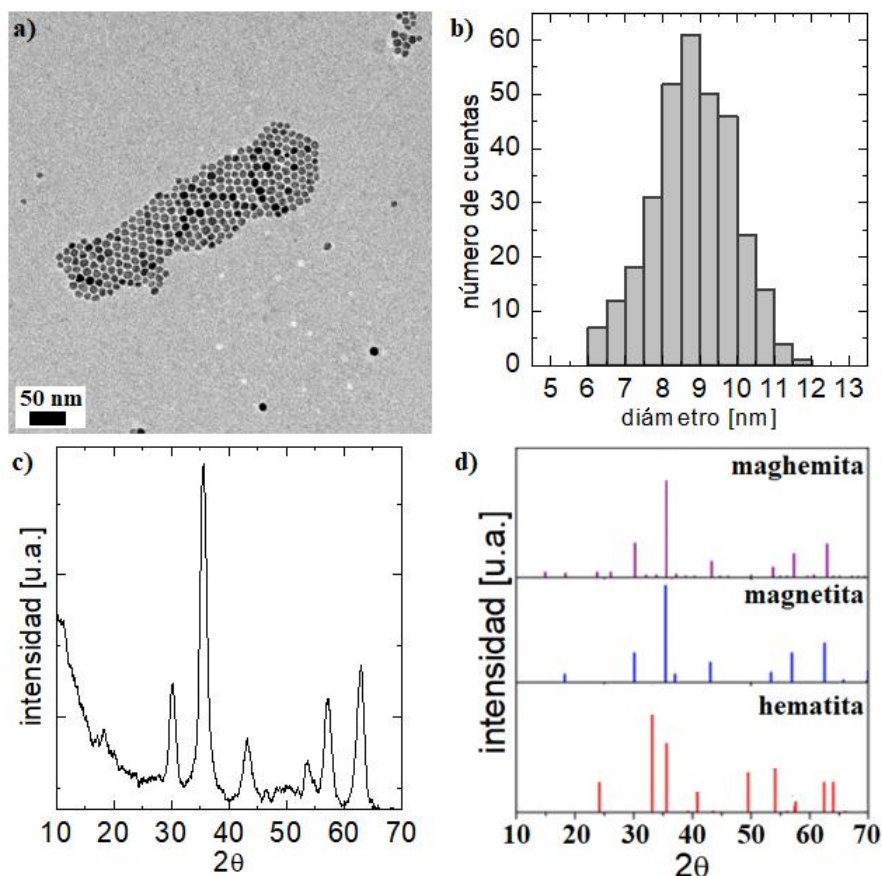


Figura 3.3: a) Imagen TEM, b) histograma de la distribución estadística de tamaños y c) difractograma de rayos X de las MNPs esféricas resultantes en una síntesis típica. d) Posiciones típicas de los picos en los espectros de XRD de diferentes formas de óxido de hierro: maghemita, magnetita y hematita, respectivamente. Adaptada de la ref. 15. Copyright (2015) con permiso de *Taylor&Francis Group*.

A continuación, se ha estudiado la influencia de la modificación de diferentes parámetros del proceso sintético en las características de las MNPs resultantes. Así, por ejemplo, se ensayaron síntesis con diferentes concentraciones de precursores metálicos o con velocidades de calentamiento hasta la temperatura de reflujo diferentes de las expuestas anteriormente. Además, en este tipo de MNPs se ha realizado un estudio mucho más completo sobre la inclusión de elementos dopantes en la estructura de las partículas que el efectuado en el caso de MNPs cúbicas, ensayando un gran número de diferentes dopajes simples, dobles y triples a partir de los precursores de manganeso, cobalto y zinc.

3.2.1.1. Influencia de la etapa de vacío, del ritmo de calentamiento y de la concentración de precursor férrico

En un primer ensayo de modificación de la síntesis típica descrita anteriormente, se suprimió la etapa de vacío primario a 110 °C, a semejanza de las pruebas efectuadas en las síntesis de los nanocubos magnéticos del capítulo anterior, dónde la eliminación del tiempo de vacío no daba lugar a variaciones relevantes en las características de los nanosistemas obtenidos. Sin embargo, en el presente tipo de síntesis la etapa de vacío es imprescindible, ya que los sistemas de MNPs obtenidos en ausencia de la misma (Figura 3.4) no tienen las características de forma y tamaño deseadas, presentando además altos grados de aglomeración y polidispersidad.

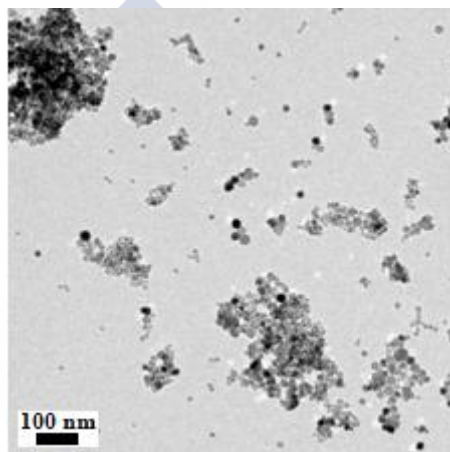


Figura 3.4: Imagen TEM de las MNPs sintetizadas en ausencia de la etapa de vacío.

Por otra parte, las características de las MNPs también se modificaron variando la tasa de incremento de temperatura en la etapa de calentamiento de 210 °C a 295 °C, temperatura de reflujo. Además del valor de 5 °C/min utilizado en la síntesis estándar, se ensayaron otras tres velocidades de calentamiento: 2, 7 y 10 °C/min. De esta manera, se observó que las MNPs disminuían de tamaño a medida que se aumentaba la velocidad de calentamiento, si bien las diferencias no fueron excesivamente grandes. El origen de este fenómeno se encuentra en la disminución del tiempo de crecimiento de las MNPs que se produce al aumentar la velocidad de calentamiento. Como se puede observar en la Figura 3.5, el diámetro de las MNPs obtenidas se incrementa de 6.54 ± 0.59 nm a 7.10 ± 0.73 nm y 9.32 ± 0.79 nm en los procesos sintéticos con tasas de incremento de temperatura de 10, 7 y 2 °C/min, respectivamente. Todas las MNPs

conservan una morfología esférica bien definida así como un alto grado de monodispersidad.

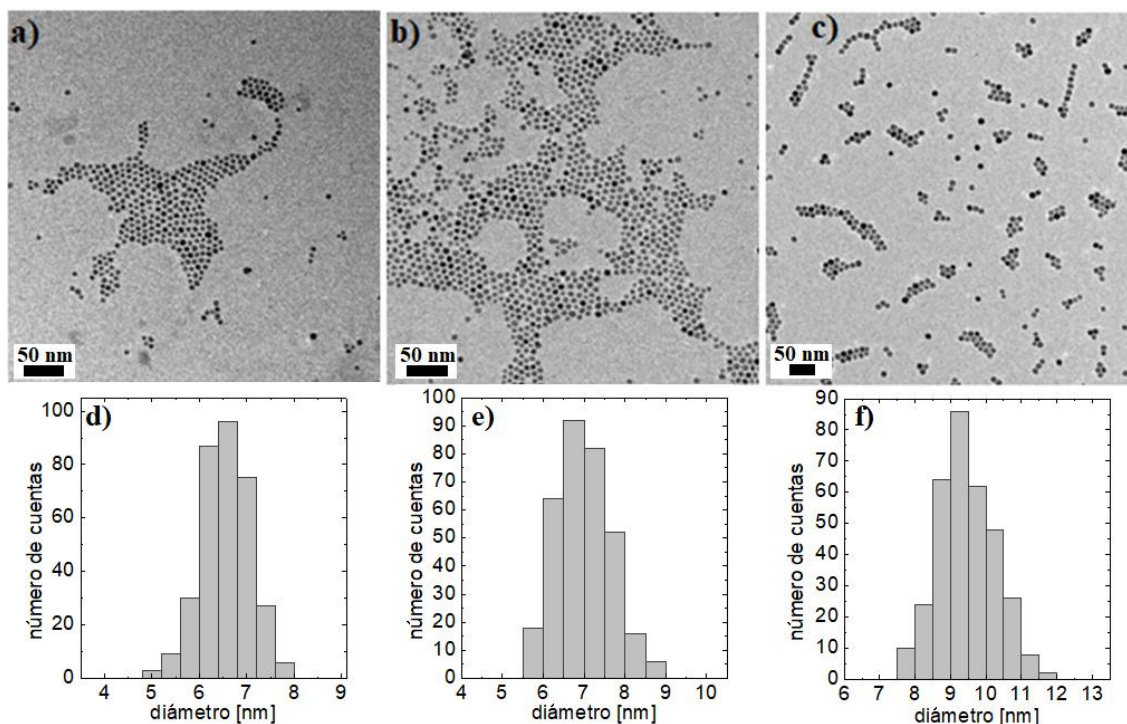


Figura 3.5: Imágenes TEM de las MNPs sintetizadas bajo distintas velocidades de calentamiento hasta la temperatura de reflujo e histogramas de las distribuciones estadísticas de tamaños: a) y d) 10 °C/min; b) y e) 7 °C/min; y c) y f) 2 °C/min.

Adicionalmente, también se ha estudiado cómo afecta a la formación de las MNPs la variación de la concentración del precursor férrico, $\text{Fe}(\text{acac})_3$. Esta concentración se ha modificado variando la masa de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ y/o el volumen de éter bencílico añadidos, pero manteniendo en todos los casos las mismas razones molares entre dicho precursor y los diferentes agentes estabilizantes y reductores (ácido oleico, oleilamina y 1,2-hexadecanediol) que se implementaron en la síntesis típica. A mayores de la concentración de 150 mM empleada en dicha síntesis típica (3 mmol de precursor en 20 ml de éter bencílico), se ensayaron otras dos concentraciones de las disoluciones precursoras, 83 mM y 300 mM, que se prepararon empleando las cantidades que se detallan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Concentraciones de precursor férrico ensayadas y tamaño de las MNPs resultantes.

M (Fe(acac) ₃) [mmol]	V (éter) [ml]	C (Fe(acac) ₃) [mM]	Tamaño [nm]
1.5	18	83	5.41 ± 0.51
3.0	10	300	13.2 ± 1.0

Así, se observó que el tamaño de las MNPs aumenta a medida que se incrementa la concentración de Fe(acac)₃ en la disolución precursora, conservando intactas las características morfológicas de las partículas: disminuyendo la concentración a 0.083 M el tamaño de las MNPs resultantes decayó a 5.41 ± 0.51 nm, mientras que al elevar la concentración a 0.300 M el tamaño pasó a ser de 13.2 ± 1.0 nm (Figura 3.6). Se ve, por tanto, que la modificación de este parámetro nos ofrece la posibilidad de obtener MNPs en un rango de tamaños mayor que el logrado anteriormente variando la velocidad de calentamiento, dónde todos los sistemas que se sintetizaron presentaban diámetros comprendidos entre 6.5 y 9.5 nm.

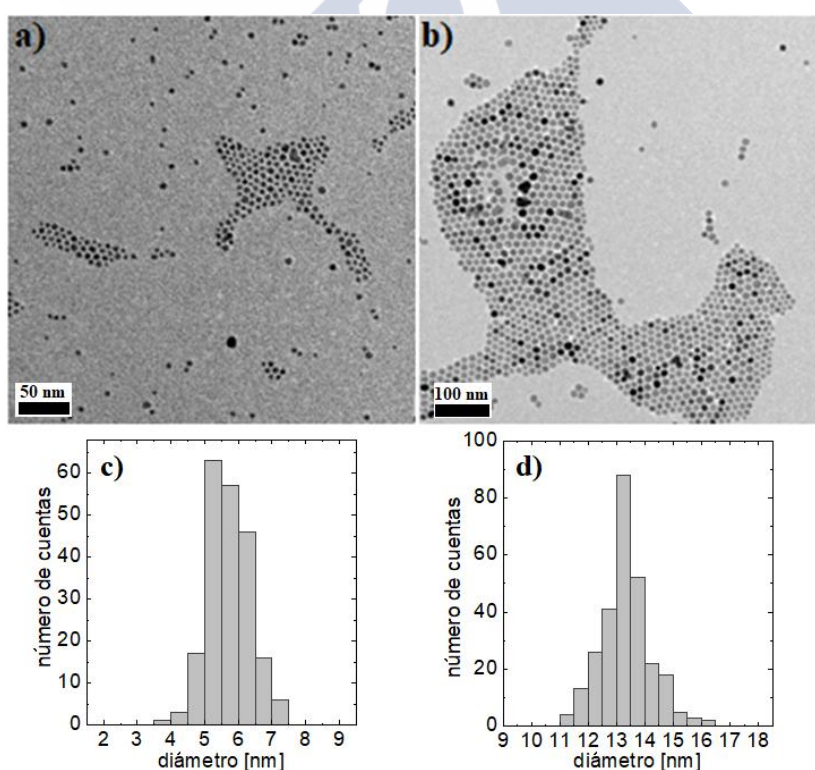


Figura 3.6: Imágenes TEM de las MNPs sintetizadas a distintas concentraciones del precursor férrico Fe(acac)₃ e histogramas de sus distribuciones estadísticas de tamaños: a) y c) 83 mM; b) y d) 300 mM.

En la Figura 3.7 se representan gráficamente las variaciones del tamaño de las MNPs obtenidas frente a la concentración de precursor férrico y frente a la rampa de temperatura utilizada en el proceso sintético, observándose en ambos casos las tendencias antes descritas.

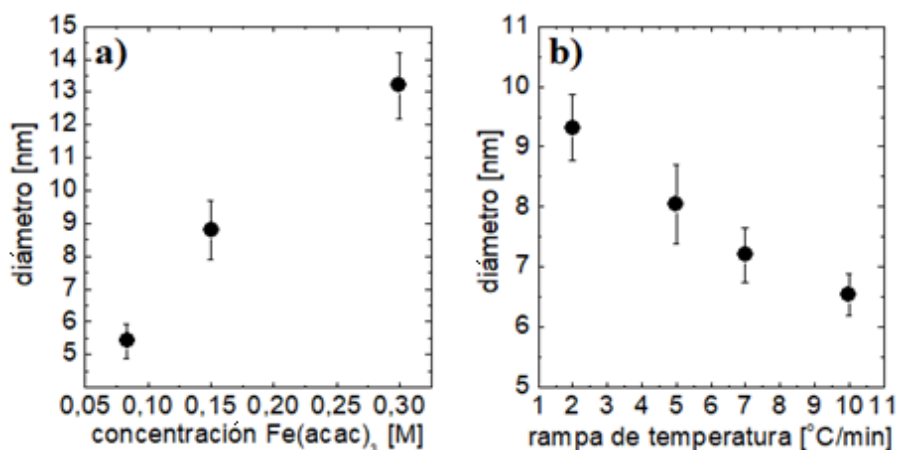


Figura 3.7: Representación gráfica del tamaño de las MNPs obtenidas frente a: a) la concentración del precursor férrico $\text{Fe}(\text{acac})_3$ y b) la rampa de temperatura.

3.2.1.2. Influencia del dopaje y escalabilidad

Como se ha mencionado anteriormente, se ha llevado a cabo un estudio completo sobre la influencia de la inclusión de los elementos dopantes manganeso, cobalto y zinc en las presentes MNPs a fin de modificar sus características físico-químicas y, principalmente, sus propiedades magnéticas. Para ello, se ha llevado a cabo la sustitución parcial del $\text{Fe}(\text{acac})_3$ por los precursores de los diferentes elementos mencionados, también en forma de acetilacetatos ($\text{Mn}(\text{acac})_2$, $\text{Co}(\text{acac})_2$ y $\text{Zn}(\text{acac})_2$) en diferentes porcentajes. Asimismo, se han ensayado distintos dopajes dobles y triples añadiendo los precursores en distintas combinaciones y proporciones a fin de encontrar las condiciones de dopado que den lugar a MNPs que posean unas propiedades magnéticas mejoradas. Se han intentado obtener MNPs de aproximadamente 8-9 nm para poder establecer una comparativa sin influencias del tamaño de las partículas en las propiedades físicas, para lo que se ha empleado el protocolo de la síntesis estándar descrita anteriormente con una concentración total de precursores en éter bencílico de 0.150 M. En la Tabla 3.4 se muestran las cantidades de precursores de los distintos elementos metálicos empleadas en cada uno de los procesos sintéticos ensayados, así

como el tamaño de las MNPs obtenidas y la composición de las mismas determinada mediante ICP-MS.

Tabla 3.4: Cantidades de precursores de hierro, cobalto, manganeso y zinc empleadas en las síntesis, tamaño y composición de las diferentes MNPs obtenidas.

	Fe(acac) ₃ [mmol]	Mn(acac) ₂ [mmol]	Co(acac) ₂ [mmol]	Zn(acac) ₂ [mmol]	Composición ICP-MS	Tamaño [nm]
.	3.00	-	-	-	Fe ₃ O ₄	8.80 ± 0.93
MN	2.00	1.00	-	-	Mn _{0.48} Fe _{2.52} O ₄	8.83 ± 0.74
	1.75	1.25	-	-	Mn _{0.69} Fe _{2.31} O ₄	8.37 ± 0.69
	1.50	1.50	-	-	Mn _{0.72} Fe _{2.28} O ₄	8.21 ± 0.88
	1.00	2.00	-	-	Mn _{0.95} Fe _{2.05} O ₄	8.79 ± 0.75
CO	2.85	-	0.15	-	Co _{0.12} Fe _{2.88} O ₄	8.29 ± 0.89
	2.20	-	0.80	-	Co _{0.55} Fe _{2.45} O ₄	8.19 ± 0.59
	2.00	-	1.00	-	Co _{0.79} Fe _{2.21} O ₄	7.50 ± 0.67
	1.50	-	1.50	-	Co _{1.07} Fe _{1.93} O ₄	7.26 ± 0.55
ZN	2.00	-	-	1.00	Zn _{0.63} Fe _{2.37} O ₄	8.18 ± 0.75
MN-CO	2.00	0.70	0.30	-	Co _{0.28} Mn _{0.27} Fe _{2.45} O ₄	7.88 ± 0.58
	1.50	1.20	0.30	-	Co _{0.29} Mn _{0.93} Fe _{1.78} O ₄	9.53 ± 0.80
MN-ZN	2.00	0.70	-	0.30	Zn _{0.12} Mn _{0.26} Fe _{2.62} O ₄	8.48 ± 0.77
	1.50	1.20	-	0.30	Zn _{0.15} Mn _{0.55} Fe _{2.30} O ₄	8.50 ± 0.79
CO-ZN	2.00	-	0.70	0.30	Zn _{0.17} Co _{0.57} Fe _{2.26} O ₄	7.84 ± 0.92
	2.00	-	0.30	0.70	Zn _{0.32} Co _{0.26} Fe _{2.42} O ₄	8.17 ± 0.67
TRIPLE	1.50	0.60	0.60	0.30	Zn _{0.12} Co _{0.57} Mn _{0.21} Fe _{2.10} O ₄	7.11 ± 0.65
	1.50	0.60	0.30	0.60	Zn _{0.25} Co _{0.29} Mn _{0.21} Fe _{2.25} O ₄	8.58 ± 0.69
	1.50	0.30	0.60	0.60	Zn _{0.23} Co _{0.56} Mn _{0.08} Fe _{2.13} O ₄	8.08 ± 0.61
	1.10	1.00	0.60	0.30	Zn _{0.14} Co _{0.50} Mn _{0.27} Fe _{2.09} O ₄	8.57 ± 0.61
	1.10	1.00	0.30	0.60	Zn _{0.21} Co _{0.34} Mn _{0.24} Fe _{2.21} O ₄	8.63 ± 0.71

Como se observa en la última columna de la tabla anterior, la práctica totalidad de los sistemas sintetizados presentan tamaños situados en el intervalo comprendido entre 8 y 9 nm, obtenidos a través de mediciones en las imágenes de TEM; tan solo las

MNPs con estequiometrías $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$ se salen de forma clara de este rango, con unos tamaños medios de 7.11 y 7.26 nm, respectivamente. Las imágenes obtenidas mediante TEM de cada una de las síntesis anteriores se muestran en las Figuras 3.8 y 3.9. En ellas, se puede observar que todas las NPs presentan una morfología esférica bien definida, un alto grado de monodispersidad y un nivel bajo de agregación.

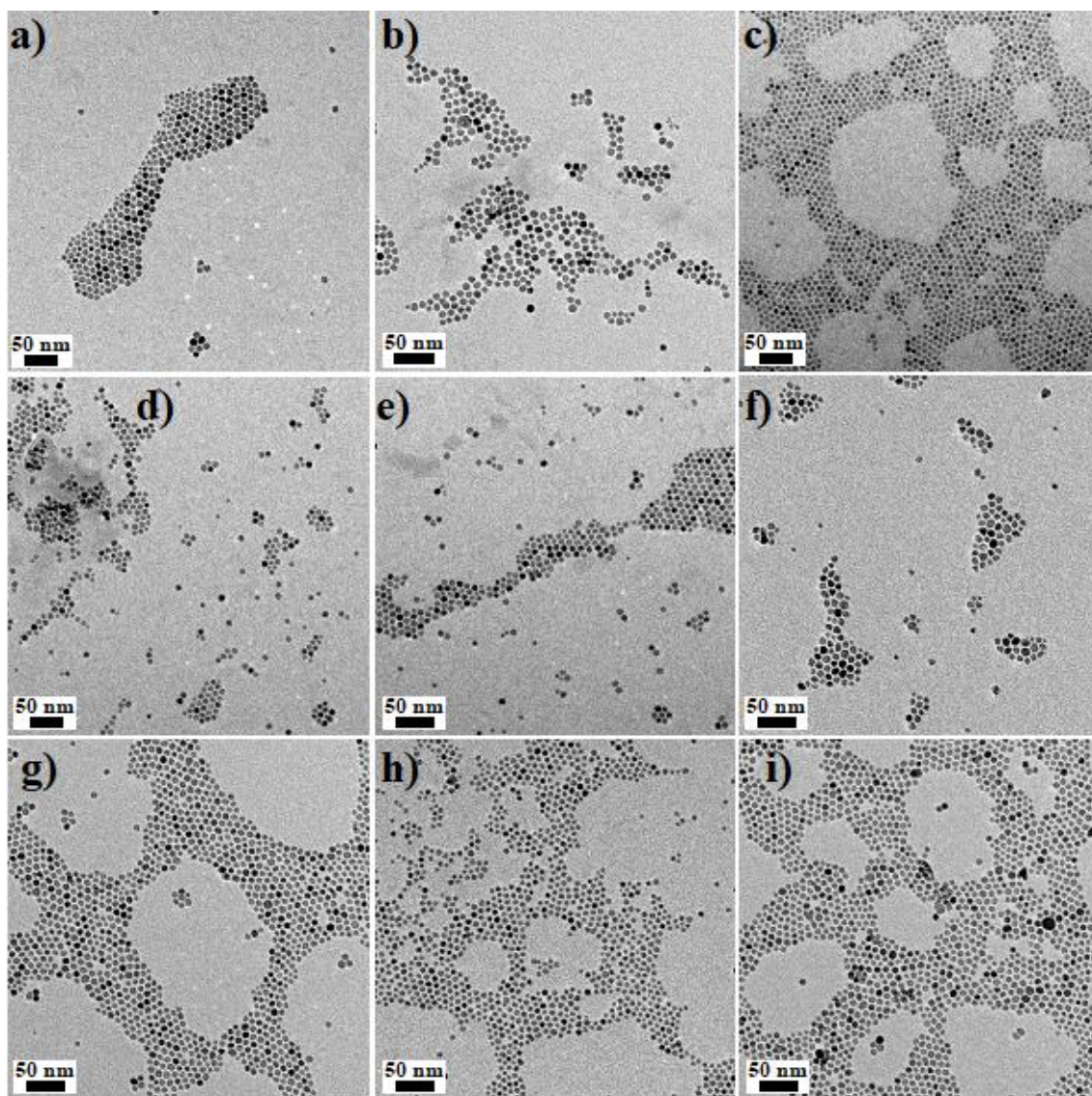


Figura 3.8: Imágenes TEM de las MNPs con las siguientes composiciones determinadas mediante medidas de ICP-MS: a) Fe_3O_4 , b) $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, c) $\text{Mn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$, d) $\text{Mn}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, e) $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, f) $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, g) $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, h) $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ e i) $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$.

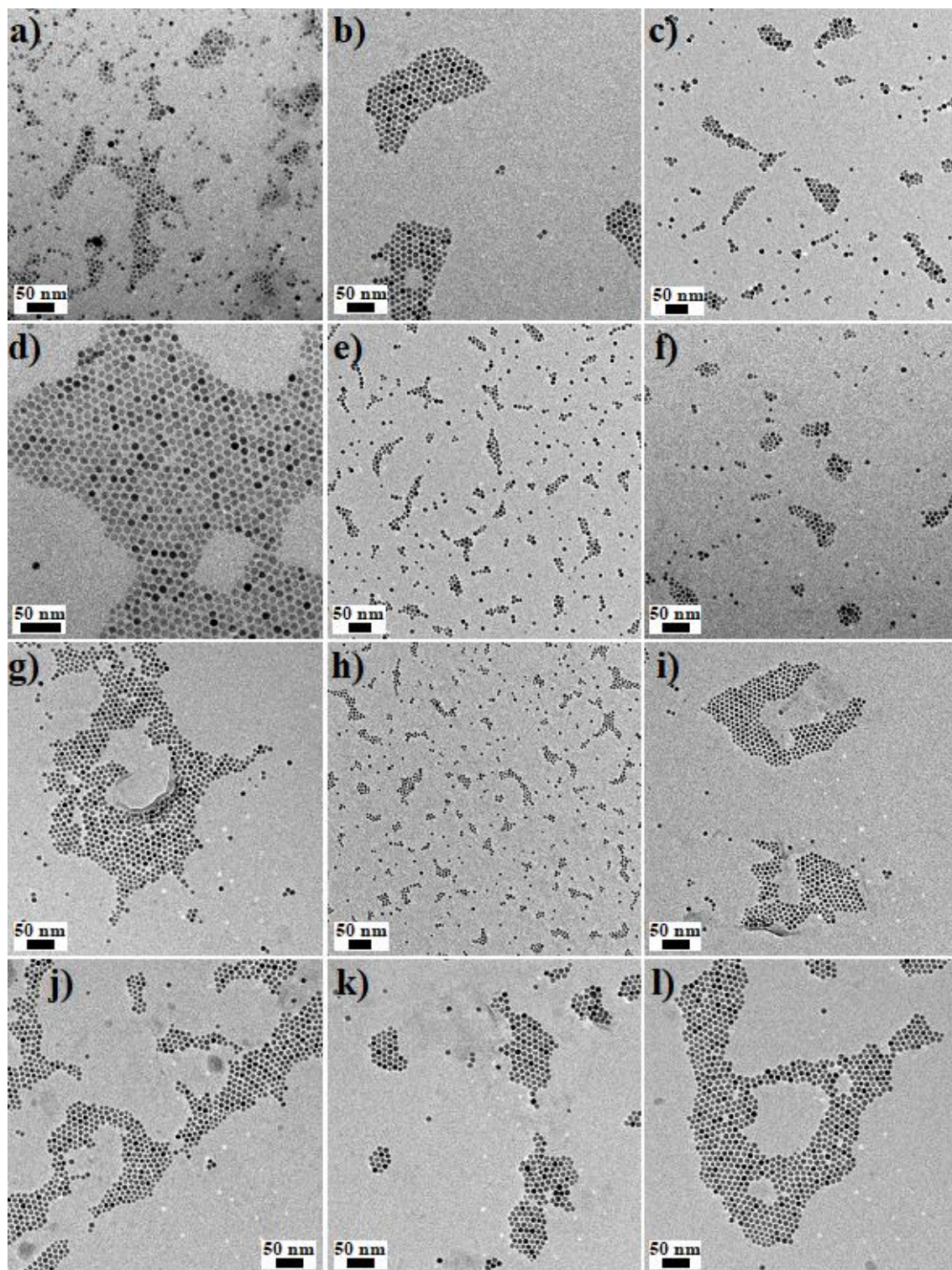


Figura 3.9: Imágenes TEM de las MNPs con las siguientes composiciones determinadas mediante medidas de ICP-MS: a) $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$, b) $\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, c) $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$, d) $\text{Zn}_{0.12}\text{Mn}_{0.26}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, e) $\text{Zn}_{0.15}\text{Mn}_{0.55}\text{Fe}_{2.30}\text{O}_4$, f) $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, g) $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, h) $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, i) $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$, j) $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$, k) $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$ y l) $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$.

Para evaluar la posibilidad de obtener una mayor cantidad de MNPs en cada reacción se efectuó un ensayo de escalabilidad del proceso sintético triplicando las cantidades de los precursores magnéticos, así como las de los demás reactivos necesarios (empleándose el sistema preparado con 2.00 mmol de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, 0.70 mmol de $\text{Zn}(\text{acac})_2$ y 0.30 mmol de $\text{Co}(\text{acac})_2$). Tal y como se puede ver en la Figura 3.10, las características en cuanto a morfología, tamaño y monodispersidad de las MNPs obtenidas son similares, por lo que se puede concluir la posibilidad de escalar al menos en un factor tres el proceso de síntesis para lograr así una mayor cantidad de producto sin que las características de los sistemas logrados varíen en exceso. Se efectuó un ensayo adicional multiplicando en este caso por seis las cantidades de reactivos habituales, encontrándose importantes problemas a nivel experimental, dada la dificultad de lograr una agitación homogénea en el elevado volumen de éter bencílico necesario para implementar una síntesis de las citadas características, y no dando lugar a MNPs de las propiedades deseadas.

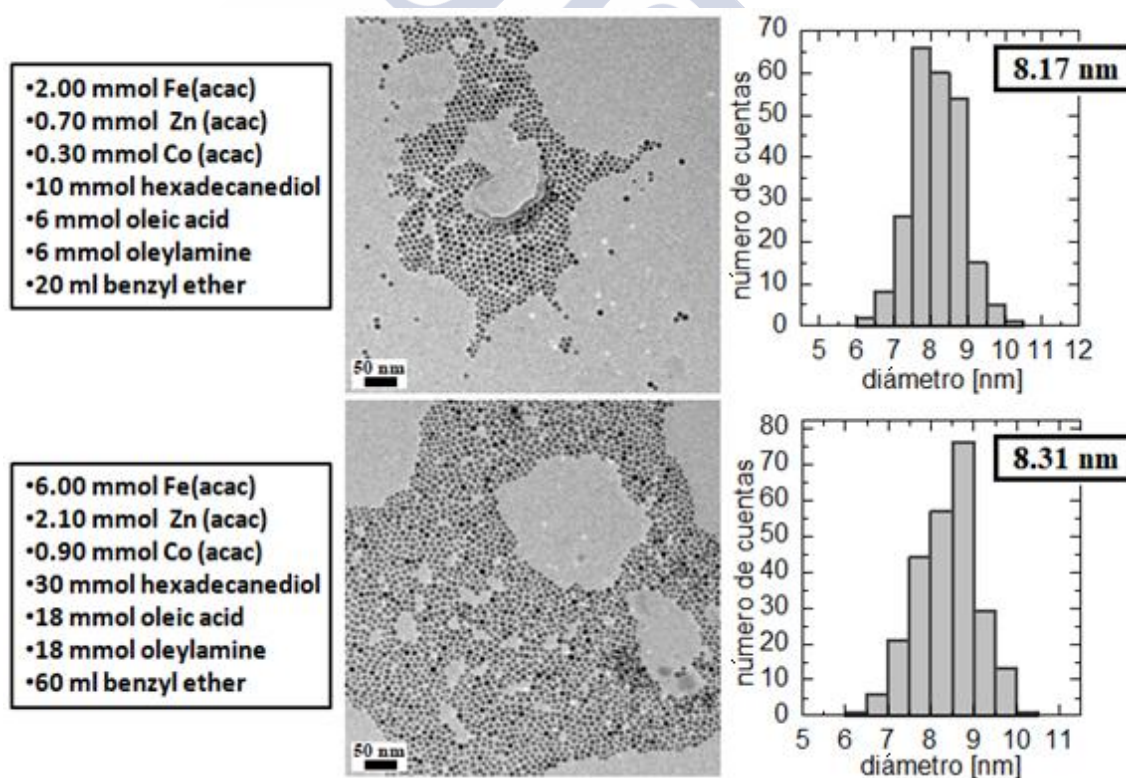


Figura 3.10: Cantidades de reactivos empleadas, imágenes de TEM e histogramas de las distribuciones estadísticas de tamaños de las MNPs obtenidas en el ensayo de escalabilidad del proceso sintético.

En lo referente al grado y eficiencia de incorporación de los elementos dopantes a la estructura de las MNPs se pueden observar diferentes comportamientos para los distintos iones (manganeso, cobalto y zinc), si bien en el presente caso estas diferencias son menos significativas que en el caso de los dopajes de los nanocubos magnéticos. En la Figura 3.11 se representan las estequiometrías de los tres elementos dopantes en las diferentes MNPs sintetizadas, obtenidas mediante ICP-MS, frente a las estequiometrías que se esperarían dados los porcentajes de los diferentes precursores magnéticos utilizados.

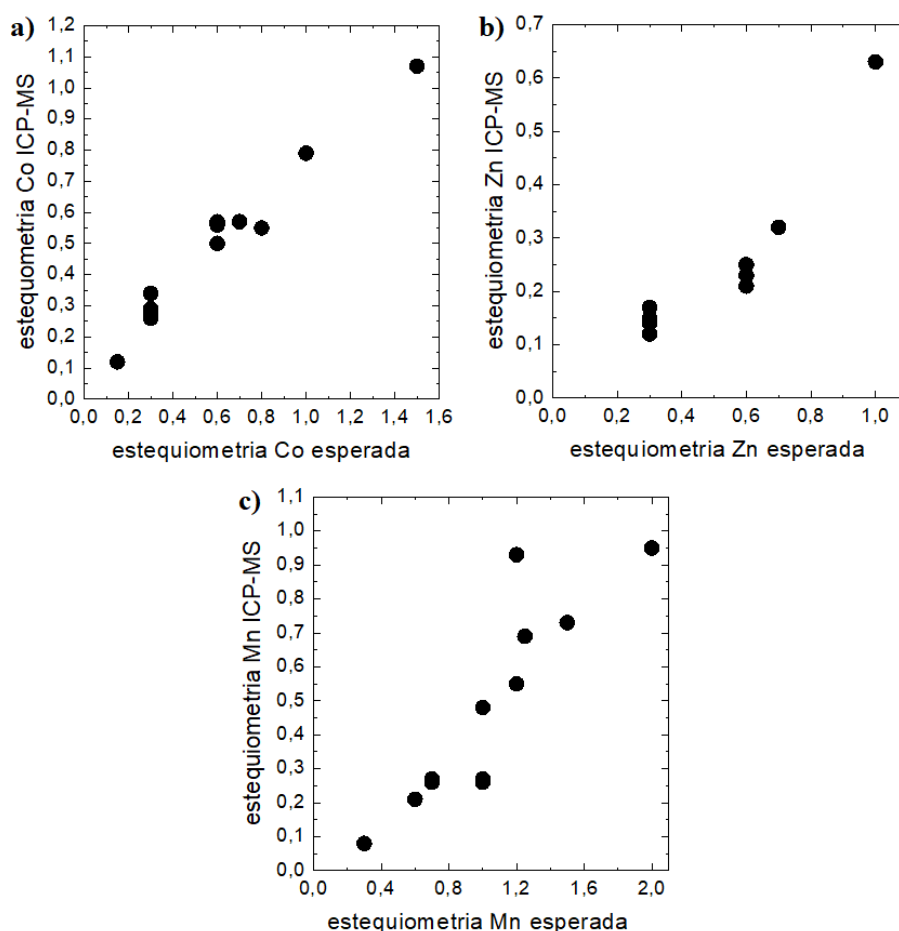


Figura 3.11: Estequiometrías de los elementos dopantes determinadas por ICP-MS frente a las esperadas dadas las razones entre precursores magnéticos implementadas; a) Co, b) Zn y c) Mn. Incertidumbre estimada máxima $\pm 5\%$.

Así, se observa que los grados de incorporación de los dopajes metálicos siguen una tendencia aproximadamente lineal, lo que nos permite conocer, con un bajo margen de incertidumbre, la composición que tendremos en nuestras MNPs a partir de la

composición de la disolución precursora. Además, se observa que, al contrario de lo que sucedía en los nanocubos, no se tienen grandes problemas para la incorporación de zinc y, especialmente, de manganeso. Estos, al igual que el cobalto, se incorporan a la estructura de los sistemas de forma consistente, tanto si el grado de sustitución es bajo como elevado, comportamiento que no varía en exceso cuando se incorporan dopajes dobles o triples. Solo a los más elevados grados de sustitución se observan leves tendencias a la saturación, disminuyendo ligeramente los porcentajes de incorporación de los dopantes, si bien se trata de diferencias sutiles. Además, como se observa en las fotografías de TEM de las Figuras 3.8 y 3.9, las MNPs no pierden las características deseadas de tamaño, morfología y monodispersidad incluso en los grados de dopaje más elevados. En lo referente a los porcentajes de incorporación de los diferentes elementos dopantes, se observa una tendencia similar a la observada con los nanocubos, con valores similares para manganeso y zinc, si bien ligeramente superior para este último, y un valor notablemente más alto para el cobalto. Sin embargo, a pesar de que la tendencia es similar, los valores de los porcentajes de inclusión son claramente más elevados en este tipo de sistemas, situándose en torno al 40-45% en los dopajes con zinc y manganeso, y cerca del 90% en los dopajes con cobalto, tal y como se muestra en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Porcentajes promedios de incorporación de los elementos dopantes cobalto, zinc y manganeso a la estructura de las MNPs.

Dopante	% incorporación
Cobalto	$(86.6 \pm 7.4) \%$
Zinc	$(45.7 \pm 6.4) \%$
Manganeso	$(40.4 \pm 7.1) \%$

Si se calcula el grado de incorporación de cada uno de los tres elementos dopantes en la red cristalina de las MNPs en cada uno de los siete tipos diferentes de dopajes simples, dobles y triples ensayados, los valores promedios obtenidos son los que se muestran a continuación en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6: Porcentajes medios de incorporación de los elementos dopantes a la estructura de las MNPs en función del tipo de dopaje simple, doble o triple ensayado.

Dopaje	% incorp. Co	% incorp. Mn	% incorp. Zn
Co simple	78.8	-	-
Mn simple	-	49.7	-
Zn simple	-	-	63.0
Co - Mn	95.0	58.0	-
Co - Zn	84.0	-	51.2
Mn - Zn	-	41.5	43.5
Triple	96.3	29.6	40.3

Se observa que la gran mayoría de los valores mostrados en la Tabla 3.6 son similares a los valores medios expuestos para cada elemento en la Tabla 3.5, estando muchos de ellos, incluso, dentro de los márgenes de incertidumbre. No obstante, llama la atención el alto grado de incorporación del zinc cuando este actúa como único elemento dopante en comparación a cuando lo hace en competencia con las presencias de cobalto y/o manganeso, pasando de un valor promedio de incorporación del 46% a un 63%; mientras que en los dopajes con cobalto sucede al revés, siendo el porcentaje de incorporación mínimo cuando actúa como único elemento dopante (79% frente a un valor promedio superior al 86%). En el caso del manganeso, destaca su baja incorporación cuando el sistema sintetizado incluye los tres elementos dopantes, cayendo, en este caso, a un 30% frente a un valor medio superior al 40%. Nótese, sin embargo, que en algunos de los tipos de dopajes el número de síntesis efectuadas fue reducido, motivo por el cual los porcentajes de incorporación de los diferentes elementos calculados no tienen por qué ser totalmente representativos de un comportamiento/tendencia global.

En vista de los resultados anteriores se puede concluir en primer lugar que, como norma general, los dopantes que se incorporan a las posiciones octaédricas de la estructura de espinela de las ferritas (cobalto) lo hacen en un porcentaje más elevado que los que se incorporan a las posiciones tetraédricas (zinc) o de forma mixta (manganeso), comportamiento lógico dado el mayor número de posiciones octaédricas existentes en la estructura de espinela¹⁹. En los dopajes dobles con cobalto y zinc no hay

competencia directa entre ambos elementos, dado que cada uno de estos se dispone en posiciones diferentes de la estructura, por lo que los porcentajes de incorporación no se alejan demasiado de los valores medios. Al incluir manganeso en la estructura de los sistemas, al dividirse este entre posiciones octaédricas y tetraédricas, sí aparece una competencia entre los elementos. Así, en los dopajes dobles con zinc y manganeso se observa que ambos se incorporan de forma similar y en valores próximos a los promedios, de lo que se deduce que la mayoría del manganeso se incorpora en las posiciones octaédricas no interfiriendo de esta forma en la incorporación del zinc. Cuando el manganeso se combina con cobalto se produce la incorporación de ambos en un porcentaje elevado, lo que da pie a pensar que, en esta ocasión, gran parte del manganeso se sitúa en posiciones tetraédricas. Así pues, se puede concluir que cobalto y zinc son los primeros en disponerse en la estructura de espinela de las ferritas, posicionándose el manganeso en los lugares que estos elementos dejan libres. Esta tendencia se confirma en los dopajes triples, donde al estar presentes tanto cobalto como zinc en las posiciones octaédricas y tetraédricas, respectivamente, queda poco lugar para un manganeso que se incorpora en muy bajo porcentaje²⁰. Además de la afinidad de los elementos dopantes por unas u otras posiciones dentro de la estructura de espinela como consecuencia de su configuración electrónica, el cual es el factor más importante que determina la incorporación de los mismos, deben considerarse también sus diferentes tamaños y masas atómicas. De este modo, el elevado tamaño de los átomos de manganeso, notablemente superior a los de cobalto y zinc, también puede contribuir a dificultar su incorporación a la estructura cristalina de las MNPs, concluyéndose la mayor facilidad de los átomos de reducido tamaño para tomar el lugar de los átomos de hierro y pasar así a formar parte de los sistemas²¹.

Una vez sintetizadas las diferentes MNPs y analizado el grado de incorporación de los elementos dopantes a la estructura de las mismas, de cara a finalizar el estudio estructural de los sistemas es importante determinar si estos mantienen la estructura cristalina tras la inclusión de zinc, cobalto y/o manganeso. Las MNPs de óxido de hierro sin dopaje, sintetizadas usando $\text{Fe}(\text{acac})_3$ como único precursor metálico, fueron estudiadas mediante XRD y depararon un patrón de difracción cuyos picos indicaban que la estructura cristalina mayoritaria era la de la magnetita, Fe_3O_4 . Por tanto, es necesario comprobar de nuevo mediante medidas de XRD si esta estructura se mantiene al incluir los diferentes elementos dopantes. Así, se estudiaron, a modo de ejemplo, tres

sistemas de MNPs con dopajes simples con zinc, cobalto y manganeso, respectivamente, y dos sistemas dopados simultáneamente con los tres elementos en distintas proporciones. En la Figura 3.12 se muestran los difractogramas de rayos X de las cinco muestras de ferritas dopadas estudiadas.

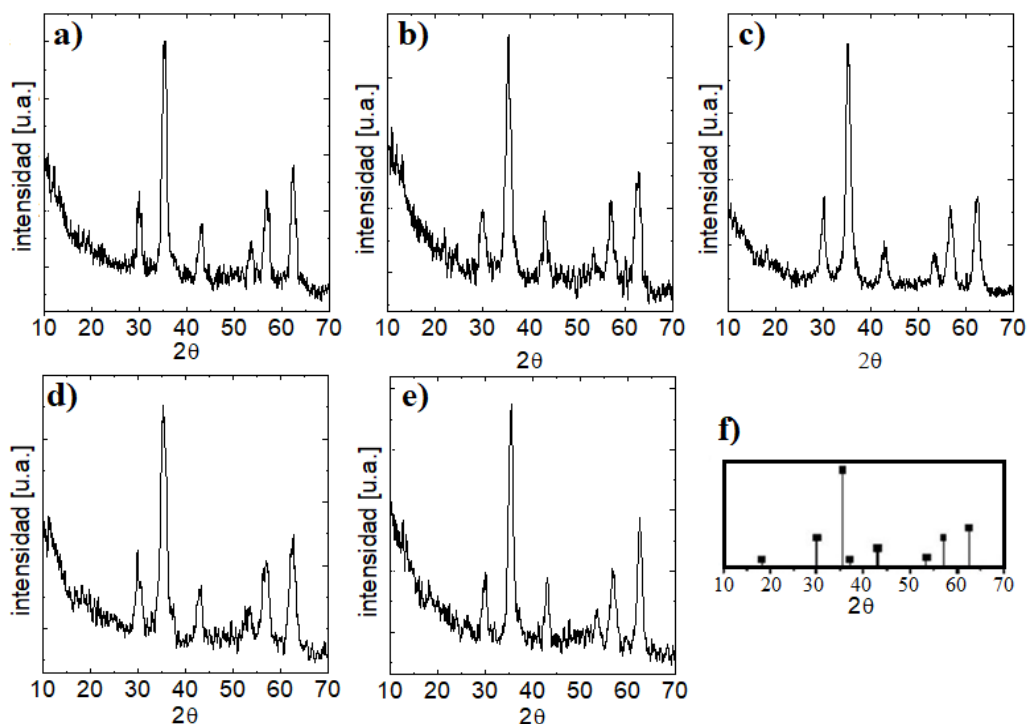


Figura 3.12: Difractogramas de rayos X de las muestras con composición determinada por ICP-MS de: a) $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, b) $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$, c) $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, d) $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ y e) $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$. f) Representación esquemática de la posición e intensidad relativa de los picos de difracción de rayos X de la estructura cristalina de la magnetita determinadas teóricamente.

De esta manera, se observa que la inclusión de los elementos dopantes no afecta a la estructura cristalina de las MNPs, ya que todos los sistemas analizados presentan los picos de difracción característicos de la estructura Fe_3O_4 , al igual que sucedía con las MNPs no dopadas¹⁷. Por tanto, se concluye que los átomos de los elementos dopantes ensayados se disponen, según corresponda, en las posiciones tetraédricas y octaédricas de la estructura de espinela inversa de la magnetita sustituyendo a los átomos de hierro, pero sin causar importantes variaciones en la cristalinidad de los sistemas. Al igual que en el caso de las MNPs de óxido de hierro, en estos cinco tipos de MNPs dopadas la presencia de la estructura de maghemita (con un espectro de

difracción de rayos X muy similar al de la magnetita) se descartó por la ausencia de los picos de reducida intensidad característicos de la misma.

3.2.2. Transferencia a medio acuoso y estabilidad de las MNPs de forma esférica

Tras la síntesis por descomposición térmica, los diferentes sistemas de MNPs presentaban un recubrimiento de ácido oleico y oleilamina, haciéndolas sólo solubles en disolventes de baja polaridad como, por ejemplo, tolueno o hexano. De cara a su transferencia a un medio acuoso, se llevó a cabo un proceso de recubrimiento de las MNPs con el polímero PMA modificado con dodecilamina en un 75%, siguiendo el protocolo ya expuesto en el apartado de Materiales y Métodos¹³. Dados los tamaños de partícula de los diferentes sistemas sintetizados, en todos los casos en el entorno de 8 nm, se determinó experimentalmente que la cantidad de monómeros de PMA por unidad de superficie libre de MNPs necesaria para la correcta transferencia de fase era de $400 \text{ monómeros} \cdot \text{nm}^{-2}$. Tras efectuar el recubrimiento polimérico las MNPs fueron redispersadas en agua miliQ.

Una vez transferidos los sistemas a medio acuoso, el siguiente paso fue comprobar la ausencia de agregación de los distintos tipos de MNPs así como su estabilidad en agua y en diferentes medios biológicos. De cara a la evaluación del grado de aglomeración, se estudiaron, a modo de ejemplo, dos tipos de MNPs mediante TEM, mientras que en todos los demás sistemas se efectuaron medidas de DLS para obtener el tamaño hidrodinámico de las MNPs. Asimismo, también se determinaron para todos los sistemas de partículas sus potenciales ζ como una comprobación de su correcto recubrimiento con el polímero.

3.2.2.1. Estudio de las MNPs de forma esférica transferidas a medio acuoso mediante medidas de TEM y DLS

Los sistemas de MNPs analizados mediante TEM tras el proceso de recubrimiento con PMA modificado con dodecilamina fueron los de composiciones $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$. Tal y como se puede ver en la Figura 3.13, las MNPs conservan su morfología y tamaño originales, así como un grado de

aglomeración despreciable, muy similar al que presentaban antes de su transferencia a medio acuoso. Además, las imágenes de TEM también permiten apreciar de forma muy sutil las cubiertas poliméricas crecidas alrededor de la parte inorgánica de las distintas partículas, pudiendo estimar el espesor de estas, de forma aproximada, en un valor en torno a 2-4 nm.

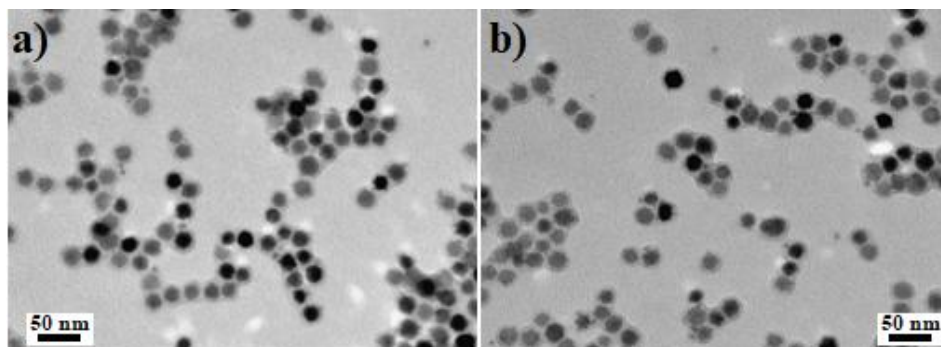


Figura 3.13: Imágenes TEM de las MNPs de composición a) $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$ y b) $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ recubiertas con el complejo PMA-dodecilamina en medio acuoso.

Tras varios días de incubación en medio acuoso se observó que los diferentes sistemas de MNPs permanecieron completamente estables, hecho indicativo de que el recubrimiento polimérico efectuado no dio lugar a fenómenos de agregación de ningún tipo en los mismos. Para comprobarlo, se midieron las distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámicos de las MNPs, obteniéndose las curvas que se muestran en las Figuras 3.14 y 3.15 (tres medidas para cada muestra), con los valores promedio indicados en la Tabla 3.7.

Se puede comprobar que todos las MNPs presentan tan solo un único pico en sus distribuciones de tamaños, presentando estos una anchura reducida, lo cual es indicativo de su carácter monodisperso, con una sola población de MNPs, y sin agregados importantes de diferentes tamaños. En cuanto a los valores promedios de los diámetros hidrodinámicos obtenidos, todos ellos se encuentran por debajo de 30 nm, estando la gran mayoría de ellos comprendidos en el rango entre los 18 nm y los 25 nm. El espesor del recubrimiento polimérico de las MNPs se estima, en base a la muestra de la que obtuvimos imagen de TEM, entre 2 y 4 nm, lo cual implica que el diámetro aproximado de las MNPs transferidas a medio acuoso se sitúa en torno a los 15 nm. Además, debe tenerse en cuenta que, al encontrarse en disolución acuosa, se produce un fenómeno de

estiramiento de las cadenas hidrófilas del polímero, que en las medidas de tamaño hidrodinámico se traduce en una contribución extra de varios nanómetros²². Por todo ello, se puede concluir que los valores de los tamaños hidrodinámicos obtenidos mediante las medidas de DLS son razonables y consistentes con el hecho de que los diferentes sistemas de MNPs no sufrieron problemas de agregación tras efectuar la transferencia de fase.

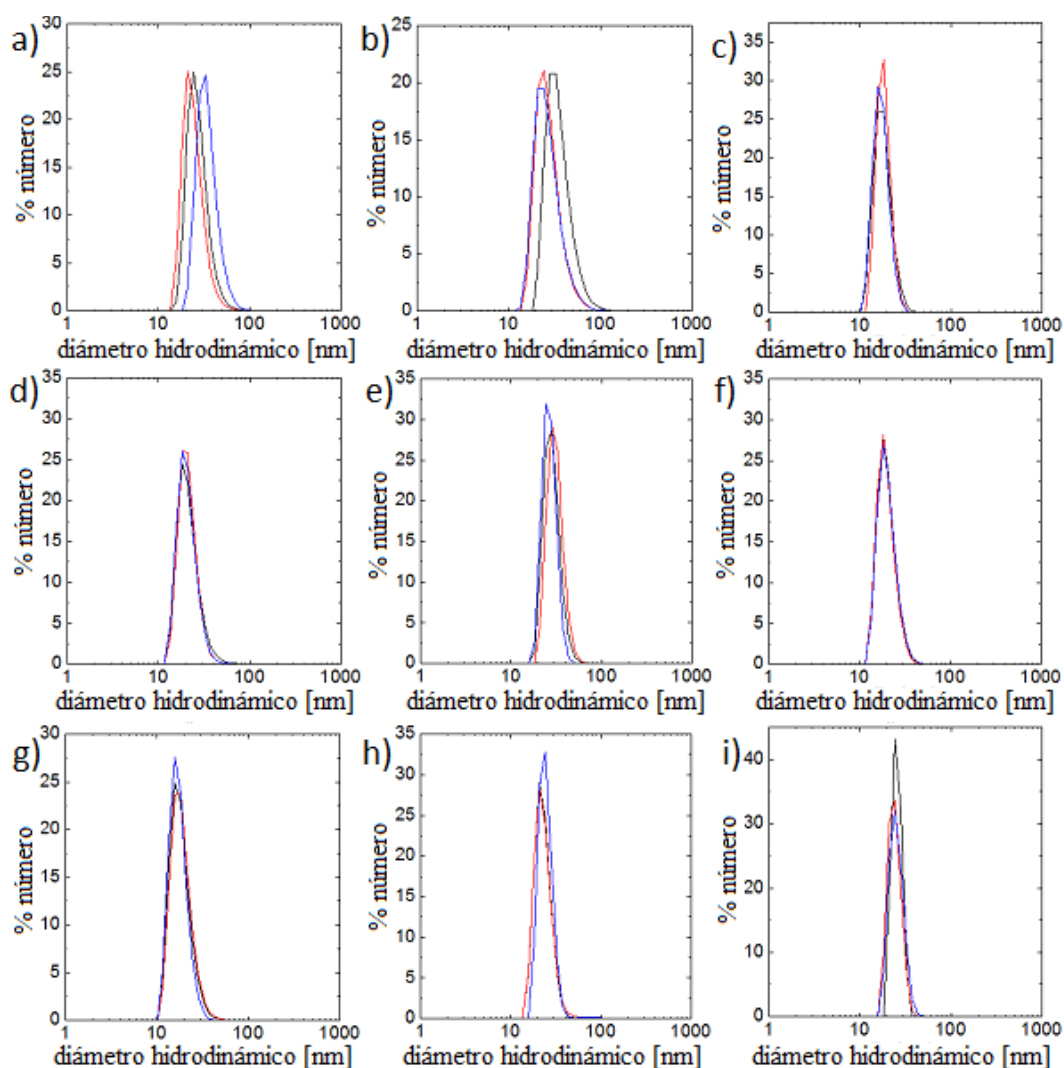


Figura 3.14: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico determinadas mediante medidas de DLS de las MNPs con las siguientes composiciones: a) Fe_3O_4 , b) $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, c) $\text{Mn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$, d) $\text{Mn}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, e) $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, f) $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, g) $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, h) $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ e i) $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$.

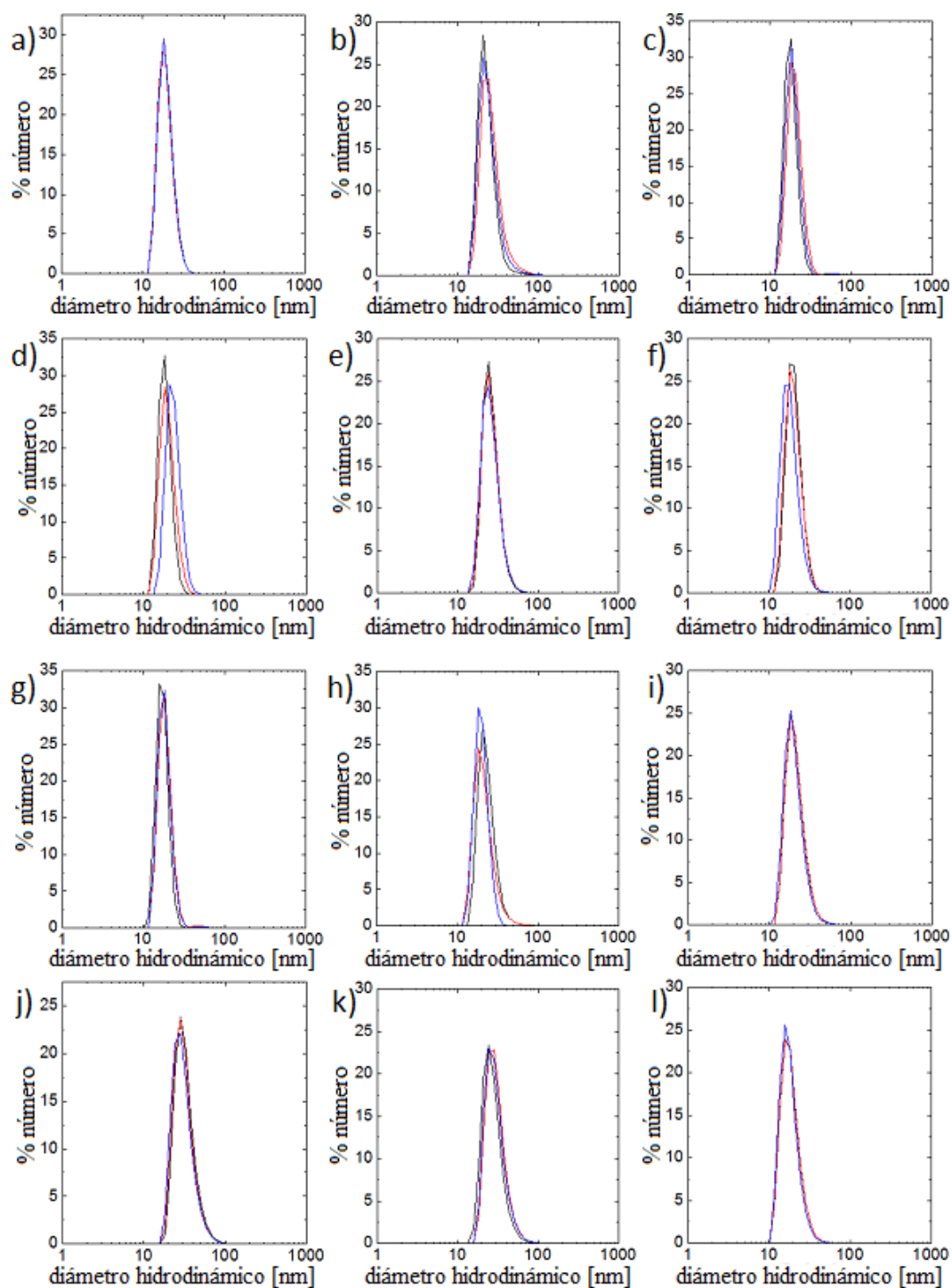


Figura 3.15: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico determinadas mediante medidas de DLS de las MNPs con las siguientes composiciones: a) $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$, b) $\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, c) $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$, d) $\text{Zn}_{0.12}\text{Mn}_{0.26}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, e) $\text{Zn}_{0.15}\text{Mn}_{0.55}\text{Fe}_{2.30}\text{O}_4$, f) $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, g) $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, h) $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, i) $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$, j) $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$, k) $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$ y l) $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$.

Tabla 3.7: Valores promedio de los tamaños hidrodinámicos de las diferentes MNPs (tres medidas efectuadas).

	Composición ICP-MS	Diámetro TEM (fase orgánica) [nm]	Diámetro hidrodinámico (fase acuosa) [nm]
.	Fe_3O_4	8.80 ± 0.93	28.9 ± 9.2
MN	$\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$	8.83 ± 0.74	30 ± 10
	$\text{Mn}_{0.69}\text{Fe}_{2.31}\text{O}_4$	8.37 ± 0.69	17.9 ± 3.6
	$\text{Mn}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$	8.21 ± 0.88	21.2 ± 6.0
	$\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$	8.79 ± 0.75	28.8 ± 5.9
CO	$\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$	8.29 ± 0.89	20.1 ± 4.7
	$\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$	8.19 ± 0.59	18.3 ± 4.8
	$\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$	7.50 ± 0.67	23.5 ± 4.8
	$\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$	7.26 ± 0.55	27.5 ± 6.3
ZN	$\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$	8.18 ± 0.75	19.6 ± 4.1
MN-CO	$\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$	7.88 ± 0.58	24.9 ± 9.3
	$\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$	9.53 ± 0.80	19.2 ± 3.7
MN-ZN	$\text{Zn}_{0.12}\text{Mn}_{0.26}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$	8.48 ± 0.77	20.7 ± 4.7
	$\text{Zn}_{0.15}\text{Mn}_{0.55}\text{Fe}_{2.30}\text{O}_4$	8.50 ± 0.79	26.2 ± 6.8
CO-ZN	$\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$	7.84 ± 0.92	20.9 ± 5.1
	$\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$	8.17 ± 0.67	18.3 ± 3.3
TRIPLE	$\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$	7.11 ± 0.65	21.9 ± 6.7
	$\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$	8.58 ± 0.69	30.0 ± 9.8
	$\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$	8.08 ± 0.61	20.9 ± 5.9
	$\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$	8.57 ± 0.61	29.1 ± 9.0
	$\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$	8.63 ± 0.71	18.5 ± 5.1

3.2.2.2. Estudio de las MNPs de forma esférica transferidas a medio acuoso mediante la determinación del potencial ζ

La alta estabilidad coloidal mostrada por las MNPs en medio acuoso es sintomática de que el recubrimiento polimérico ha resultado exitoso, pues de otra forma la superficie hidrófoba original haría que estas fueran completamente inestables, precipitando casi de forma inmediata. No obstante, para corroborar de forma adicional la presencia del polímero en la superficie de las MNPs, se efectuaron medidas de la movilidad electroforética de cada uno de los sistemas sintetizados, a partir de las cuales se determinaron las distribuciones estadísticas de potencial ζ de las diferentes muestras (Figuras 3.16, 3.17 y Tabla 3.8).

Por lo general, las distribuciones de potencial ζ de las MNPs presentan un único y estrecho pico, lo cual indica un recubrimiento uniforme de todas las MNPs. Tan solo en algunos sistemas, principalmente en los de composición $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$ (Figuras 3.16c, 3.16f y 3.16h) se observa que las distribuciones de potencial ζ tienen tendencia a mostrar más picos, si bien estos son muy estrechos y/o se corresponden con un valor de potencial muy próximo al del pico principal. Por ello, se puede concluir que en todas las muestras el recubrimiento de las MNPs es lo suficientemente uniforme como para dar lugar a unas distribuciones estadísticas de potencial ζ estrechas. Por su parte, los valores promedios del potencial ζ obtenidos se encuentran en su totalidad en el rango de -60 a -75 mV. Dado que el error de este tipo de medidas es relativamente significativo, tal y como se puede observar en los márgenes de incertidumbre que acompañan a los valores promedios en la Tabla 3.6, se puede afirmar que las magnitudes de todos los potenciales medidos son prácticamente coincidentes. Además, el valor negativo de los potenciales es el comportamiento esperado dado que, una vez unido el complejo PMA-dodecilamina a la superficie de las MNPs, los grupos funcionales del recubrimiento que quedan expuestos en la superficie libre son grupos carboxilo, los cuales dan lugar a la carga negativa observada en los valores de potencial ζ . El valor promedio de aproximadamente -60 mV, por su parte, es congruente con valores previamente obtenidos en sistemas de tamaño similar con recubrimientos de esta naturaleza^{9,23}. Finalmente, tal y como ya se fue comentado previamente, la estabilidad coloidal de los sistemas quedó también patente por el hecho de que las MNPs permanecieron

perfectamente dispersas en el medio acuoso sin producirse fenómenos de agregación y precipitación incluso después de transcurrir varios meses desde su funcionalización mediante la técnica de recubrimiento polimérico.

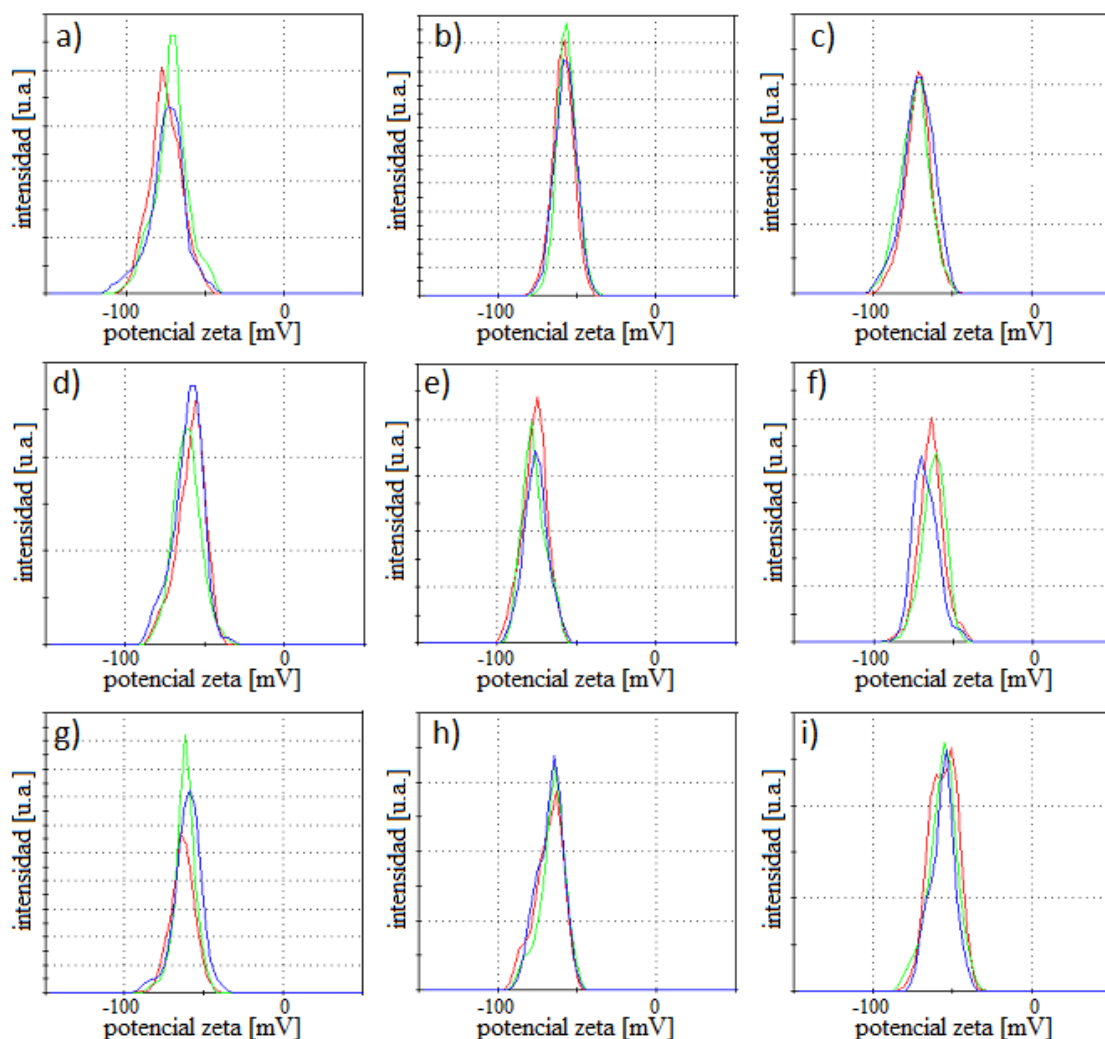


Figura 3.16: Distribuciones estadísticas del potencial ζ de las MNPs con las siguientes composiciones: a) Fe_3O_4 , b) $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, c) $\text{Mn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$, d) $\text{Mn}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$, e) $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, f) $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, g) $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, h) $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ e i) $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$.

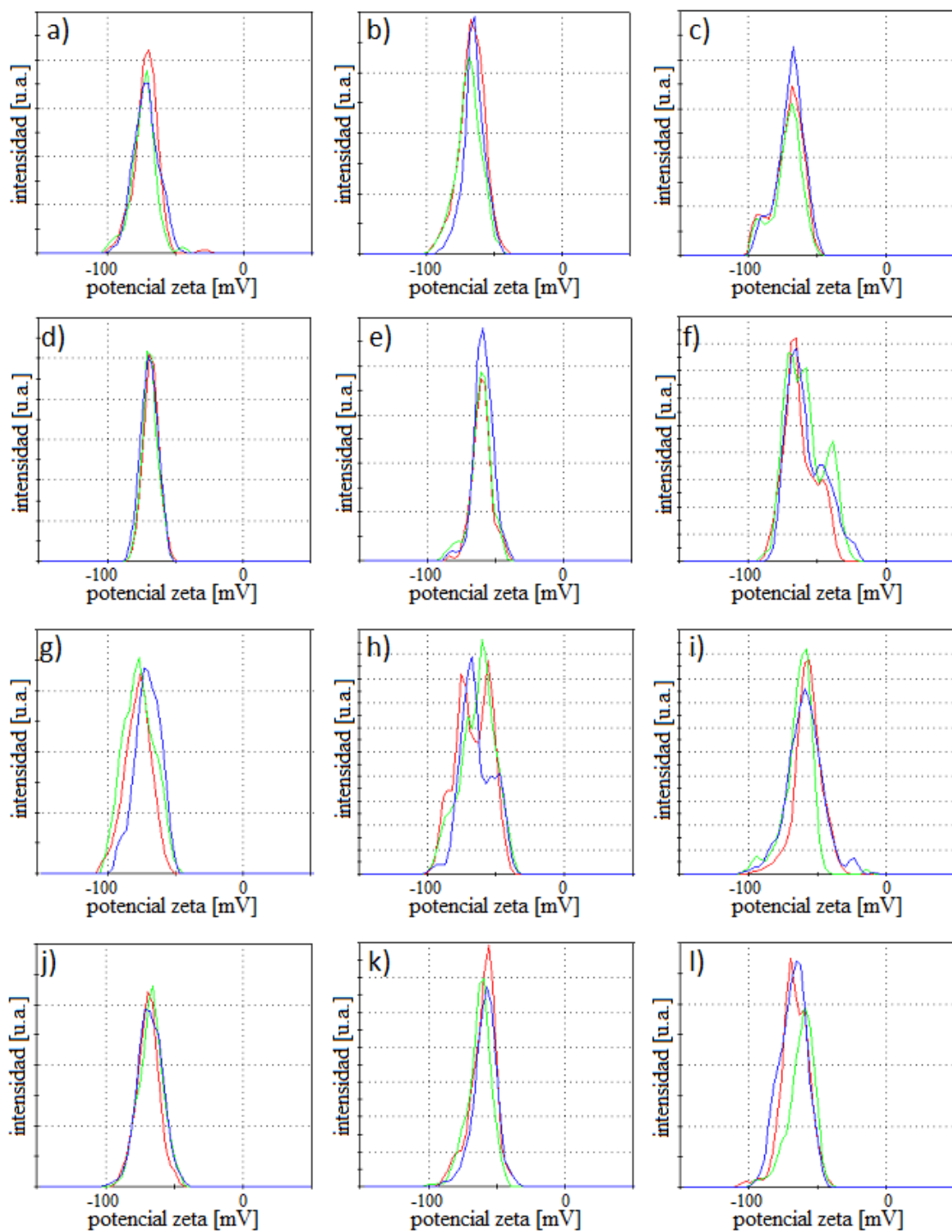


Figura 3.17: Distribuciones estadísticas del potencial ζ de las MNPs con las siguientes composiciones: a) $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$, b) $\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, c) $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$, d) $\text{Zn}_{0.12}\text{Mn}_{0.26}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, e) $\text{Zn}_{0.15}\text{Mn}_{0.55}\text{Fe}_{2.30}\text{O}_4$, f) $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, g) $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, h) $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, i) $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$, j) $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$, k) $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$ y l) $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$.

Tabla 3.8: Valores promedio del potencial ζ de los diferentes sistemas de MNPs sintetizados (tres medidas efectuadas).

	Composición ICP-MS	Potencial ζ [mV]
.	Fe_3O_4	-74 ± 11
MN	$\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$	-57.7 ± 6.6
	$\text{Mn}_{0.69}\text{Fe}_{2.31}\text{O}_4$	-72.3 ± 9.3
	$\text{Mn}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4$	-60.3 ± 9.0
	$\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$	-76.3 ± 7.6
CO	$\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$	-64.7 ± 7.7
	$\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$	-61.7 ± 8.0
	$\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$	-67.1 ± 8.6
	$\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$	-56.6 ± 8.6
ZN	$\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$	-72.2 ± 9.0
MN-CO	$\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$	-67.0 ± 9.2
	$\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$	-67.2 ± 7.2
MN-ZN	$\text{Zn}_{0.12}\text{Mn}_{0.26}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$	-68.7 ± 5.9
	$\text{Zn}_{0.15}\text{Mn}_{0.55}\text{Fe}_{2.30}\text{O}_4$	-62 ± 10
CO-ZN	$\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$	-60 ± 13
	$\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$	-73.0 ± 9.1
TRIPLE	$\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$	-65 ± 12
	$\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$	-68.1 ± 8.7
	$\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$	-60 ± 11
	$\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$	-60.6 ± 9.1
	$\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$	-64 ± 17

3.2.2.3. Estudio de la estabilidad de las MNPs de forma esférica en medios biológicos

Con el fin de comprobar la estabilidad coloidal de los sistemas magnéticos en diferentes medios biológicos, condición fundamental de cara a su implementación en potenciales aplicaciones biomédicas, se analizó la variación del tamaño hidrodinámico

de las MNPs recubiertas con PMA-dodecilamina durante 96 h en el seno de los mismos. Este tiempo resulta suficiente para comprobar si los diferentes fluidos inducen o no la agregación de los sistemas sintetizados. Los medios biológicos ensayados fueron una disolución salina tamponada con fosfato (PBS), disoluciones acuosas de cloruro de sodio (NaCl) de diferentes concentraciones, medio fagolisosomal (PSF), medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con L-glutamina, DMEM suplementado con L-glutamina y penicilina, y DMEM suplementado con L-glutamina, penicilina y suero fetal bovino (FBS). Con estos medios se pretenden simular diversos ambientes biológicos de diferente complejidad¹³. Así, mediante el ensayo en PBS simplemente se comprueba si la estabilidad de las MNPs se ve afectada en un medio con condiciones de osmolaridad y concentración iónica muy semejantes a la del líquido extracelular de los mamíferos, mientras que en las disoluciones de NaCl se simulan las diferentes condiciones de salinidad existentes en distintas partes del cuerpo humano. El DMEM es un medio que simula un plasma sanguíneo básico y que, de cara a reproducir más fielmente las condiciones reales del flujo sanguíneo, fue suplementado sucesivamente con L-glutamina, penicilina/estreptomicina y proteínas, comprobando cómo variaba la estabilidad de los sistemas de MNPs a medida que se añadía cada uno de estos elementos. Finalmente, el PSF es un medio que simula las condiciones del interior de los fagolisomas que se forman cuando las partículas penetran en el interior celular a través de un proceso de fagocitosis²⁴. Como prueba de concepto, se analizó el comportamiento de unas MNPs con dopaje triple, concretamente las de composición $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$, ya que, si bien el comportamiento en cuanto a estabilidad entre los diferentes sistemas no debe diferir dado que todos presentan tamaños y recubrimientos muy similares, de esta manera nos aseguramos de comprobar cualquier efecto anómalo que pueda ser debido a alguno de los tres elementos dopantes ensayados (manganeso, cobalto y zinc). En las Figuras 3.18 a 3.22 se muestran las distribuciones del tamaño hidrodinámico de las MNPs tras 0, 24, 72 y 96 h de incubación en los diferentes medios biológicos analizados, así como una representación gráfica de la variación de los valores medios de dichos tamaños hidrodinámicos con el tiempo.

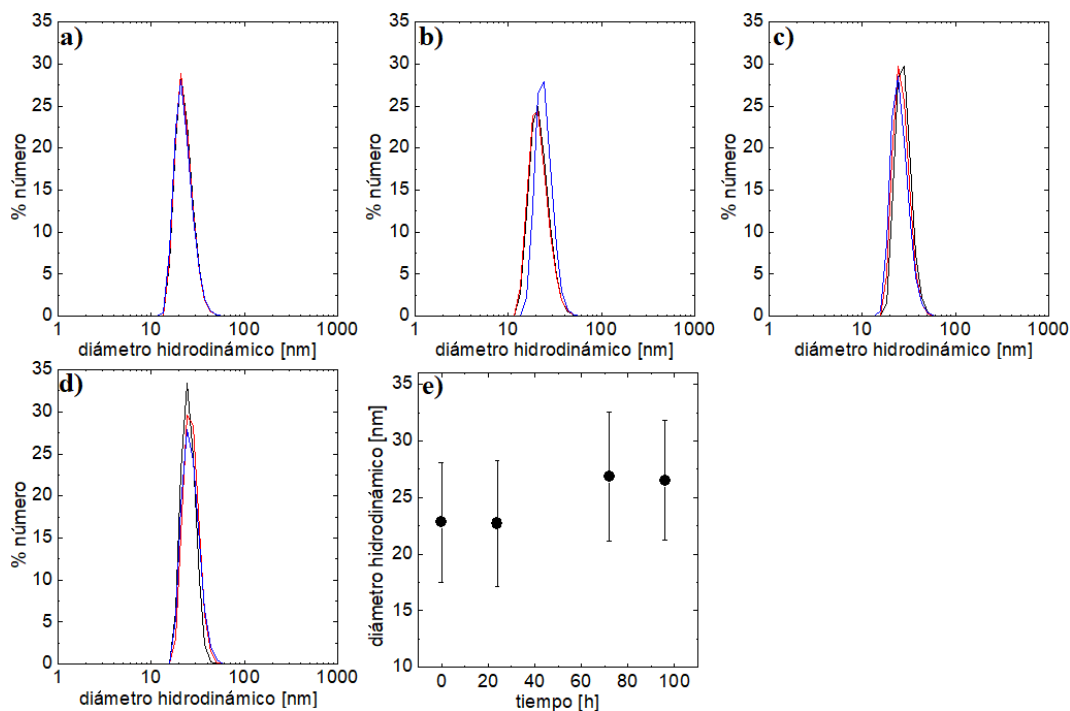


Figura 3.18: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de las MNPs en PBS tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h. e) Variación del tamaño hidrodinámico de las MNPs en PBS con el tiempo de incubación.

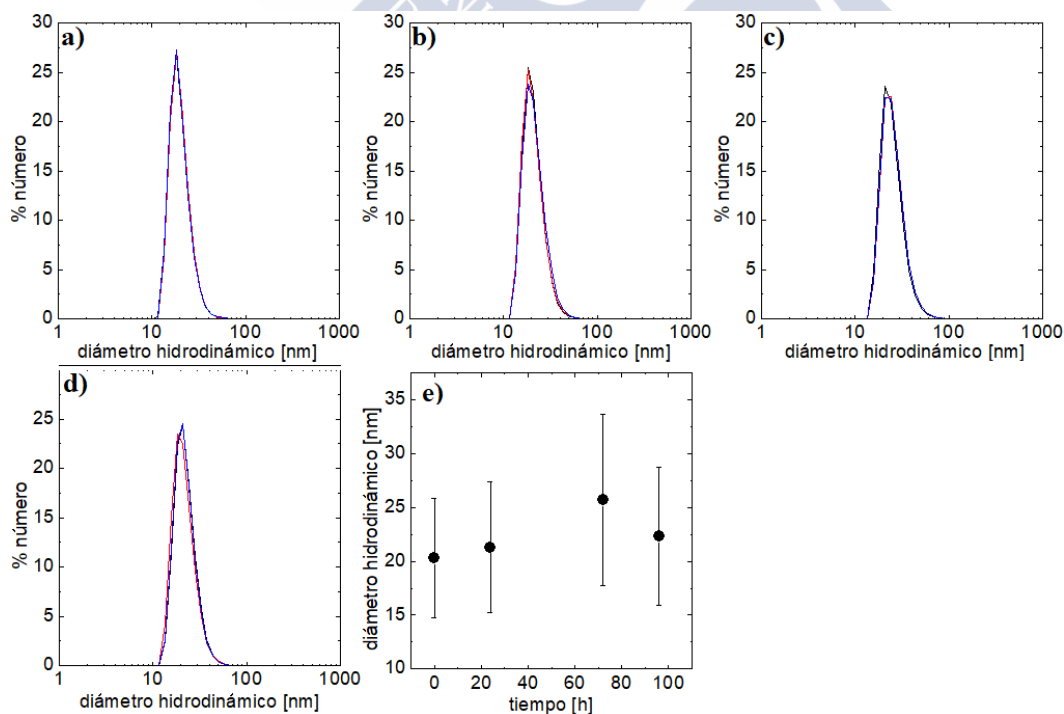


Figura 3.19: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de las MNPs en PSF tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h. e) Variación del tamaño hidrodinámico de las MNPs en PSF con el tiempo de incubación.

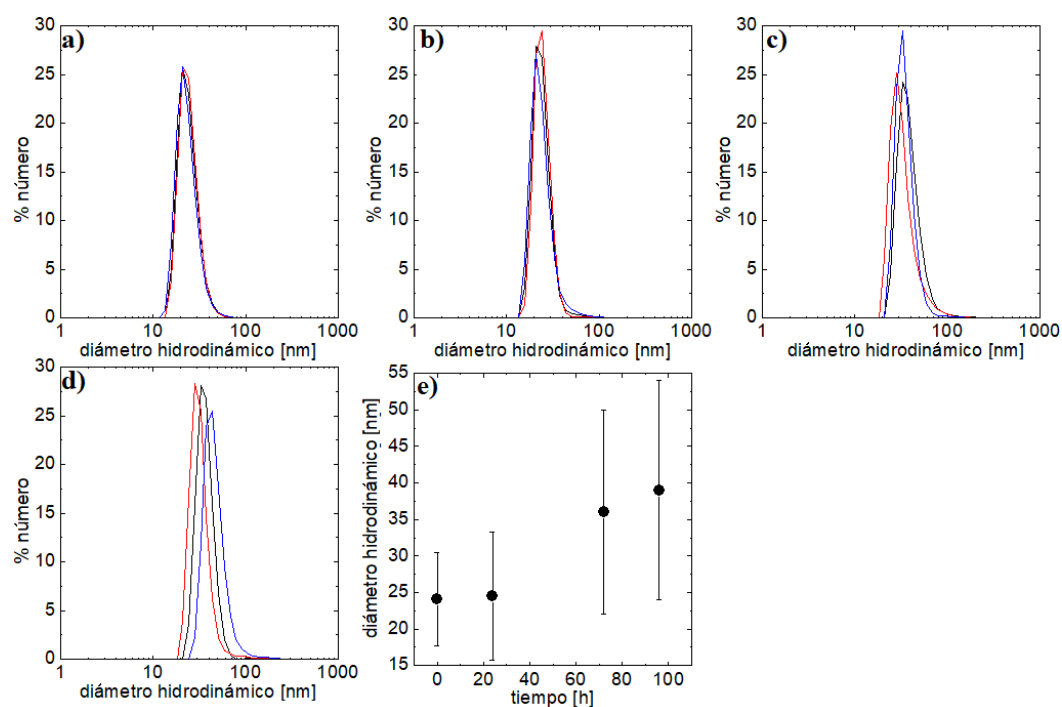


Figura 3.20: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de las MNPs en DMEM suplementado con L-glutamina tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h. e) Variación del tamaño hidrodinámico de las MNPs en DMEM-glutamina con el tiempo de incubación.

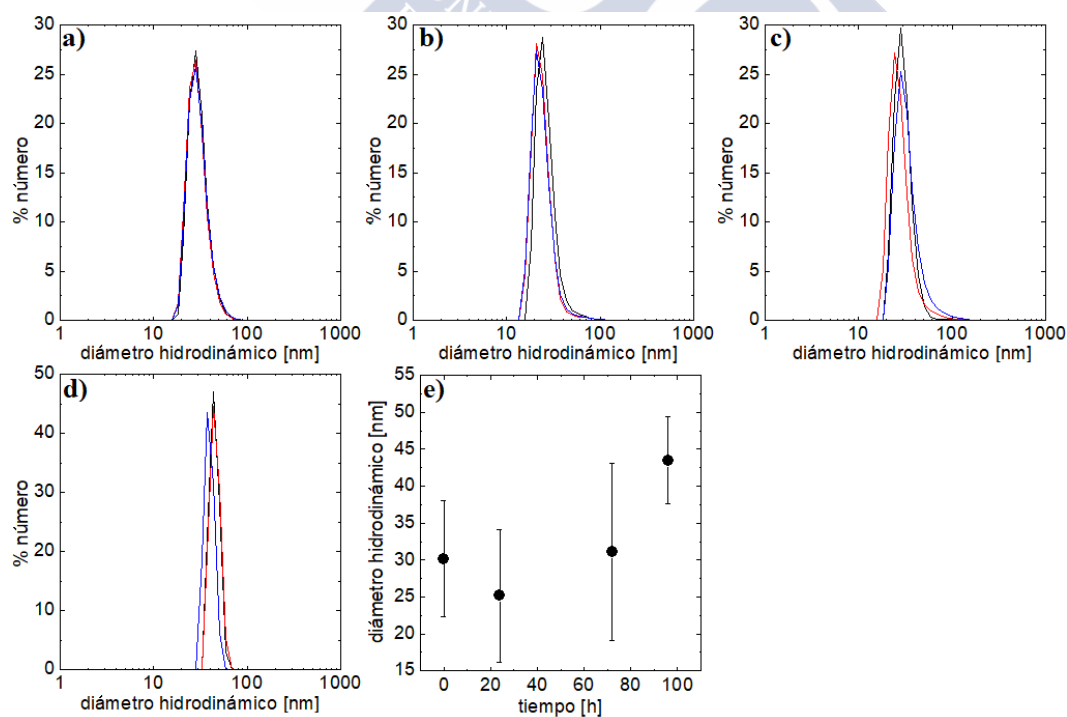


Figura 3.21: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de las MNPs en DMEM modificado con L-glutamina y penicilina tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h. e) Variación del tamaño hidrodinámico de las MNPs en DMEM-glutamina-penicilina con el tiempo de incubación.

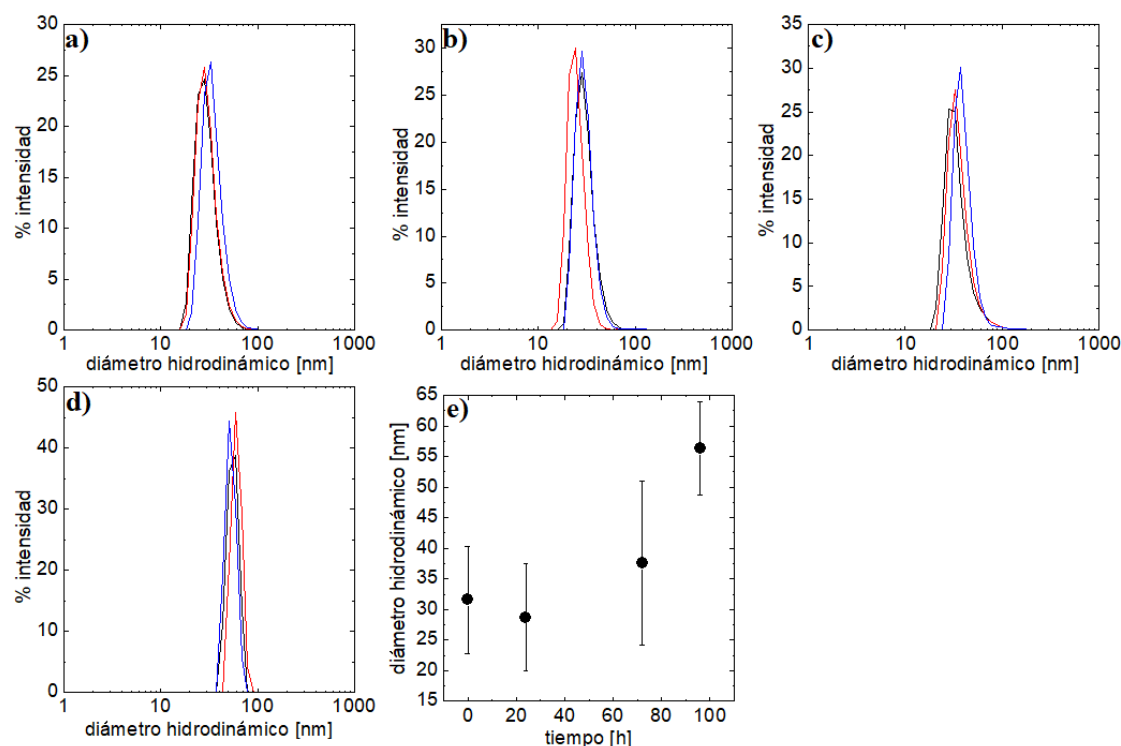


Figura 3.22: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de las MNPs en DMEM modificado con L-glutamina, penicilina y FBS tras a) 0h, b) 24h, c) 72h y d) 96h. e) Variación del tamaño hidrodinámico de las MNPs en DMEM-glutamina-penicilina-FBS con el tiempo de incubación.

Además, también se analizó la estabilidad de este mismo sistema de MNPs de composición $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$ recubiertas con el complejo PMA-dodecilamina en disoluciones de NaCl en agua de diferentes concentraciones, comprendidas entre 0.01 M y 2.50 M, durante 72 horas. Con estas disoluciones simplemente se pretenden simular las diferentes condiciones de salinidad existentes en las distintas zonas del cuerpo humano. Al igual que en los anteriores medios biológicos estudiados, dicha estabilidad coloidal se analizó mediante el análisis de la variación del tamaño hidrodinámico de los sistemas de MNPs con el tiempo de incubación (Figuras 3.23 a 3.25).

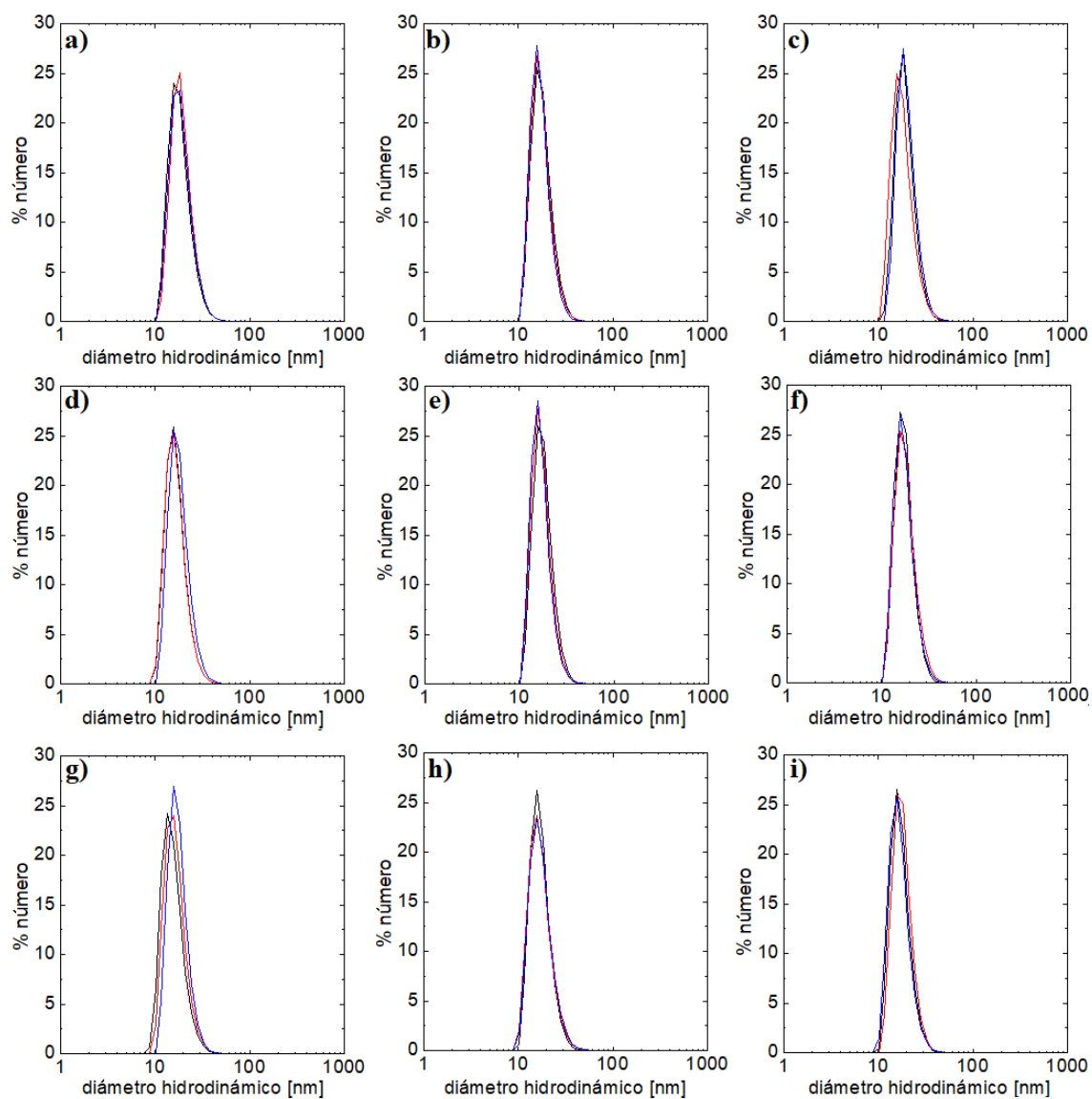


Figura 3.23: Distribuciones del tamaño hidrodinámico de las MNPs en disolución salina de concentración 0.01 M tras a) 0h, b) 24h, c) 72h de incubación; 0.02 M tras d) 0h, e) 24h, f) 72h de incubación; y 0.05 M tras g) 0h, h) 24h, i) 72h de incubación.

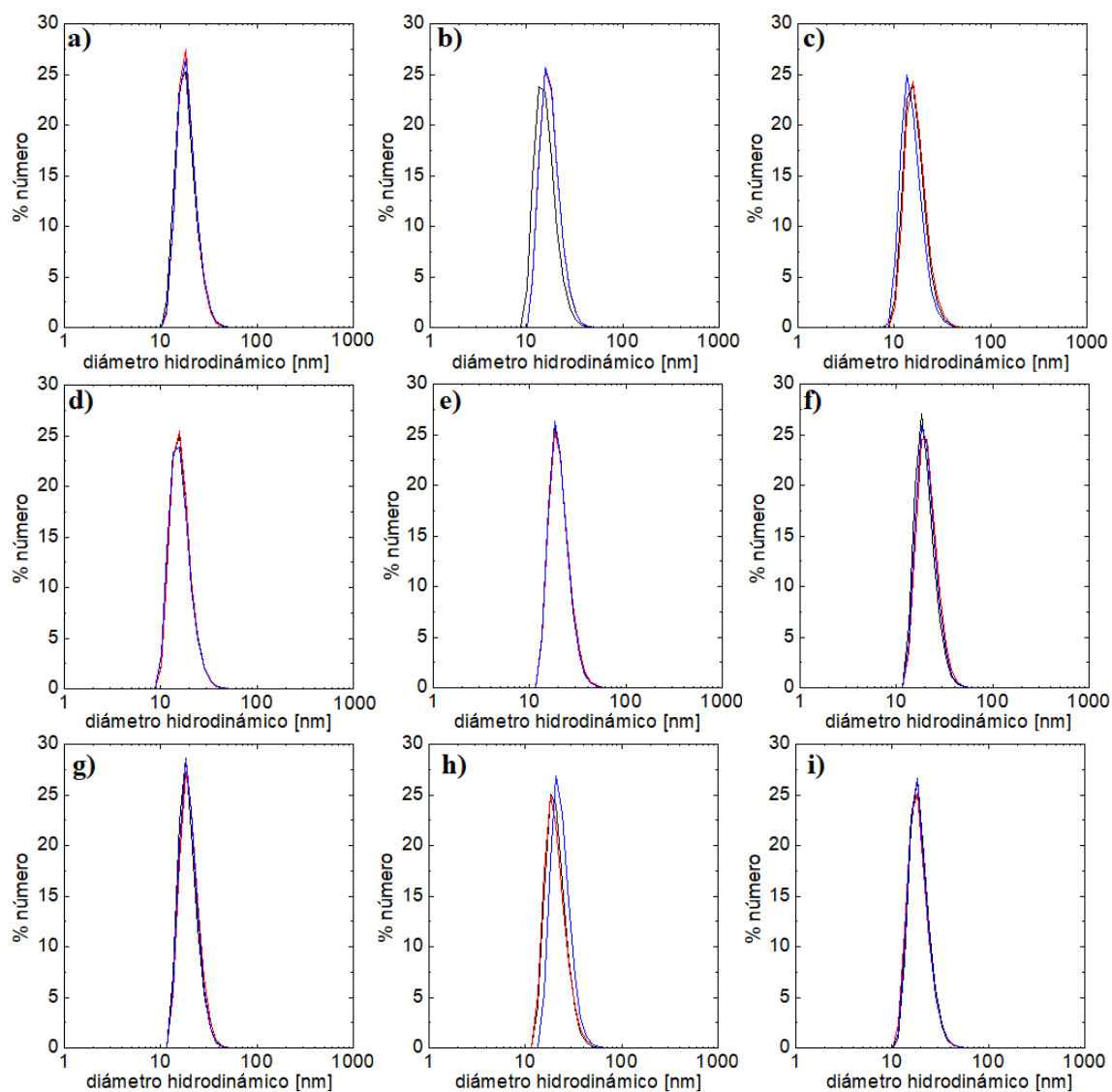


Figura 3.24: Distribuciones de tamaño hidrodinámico de las MNPs en disolución salina de concentración 0.10 M tras a) 0h, b) 24h, c) 72h de incubación; 0.20 M tras d) 0h, e) 24h, f) 72h de incubación; y 0.50 M tras g) 0h, h) 24h, i) 72h de incubación.

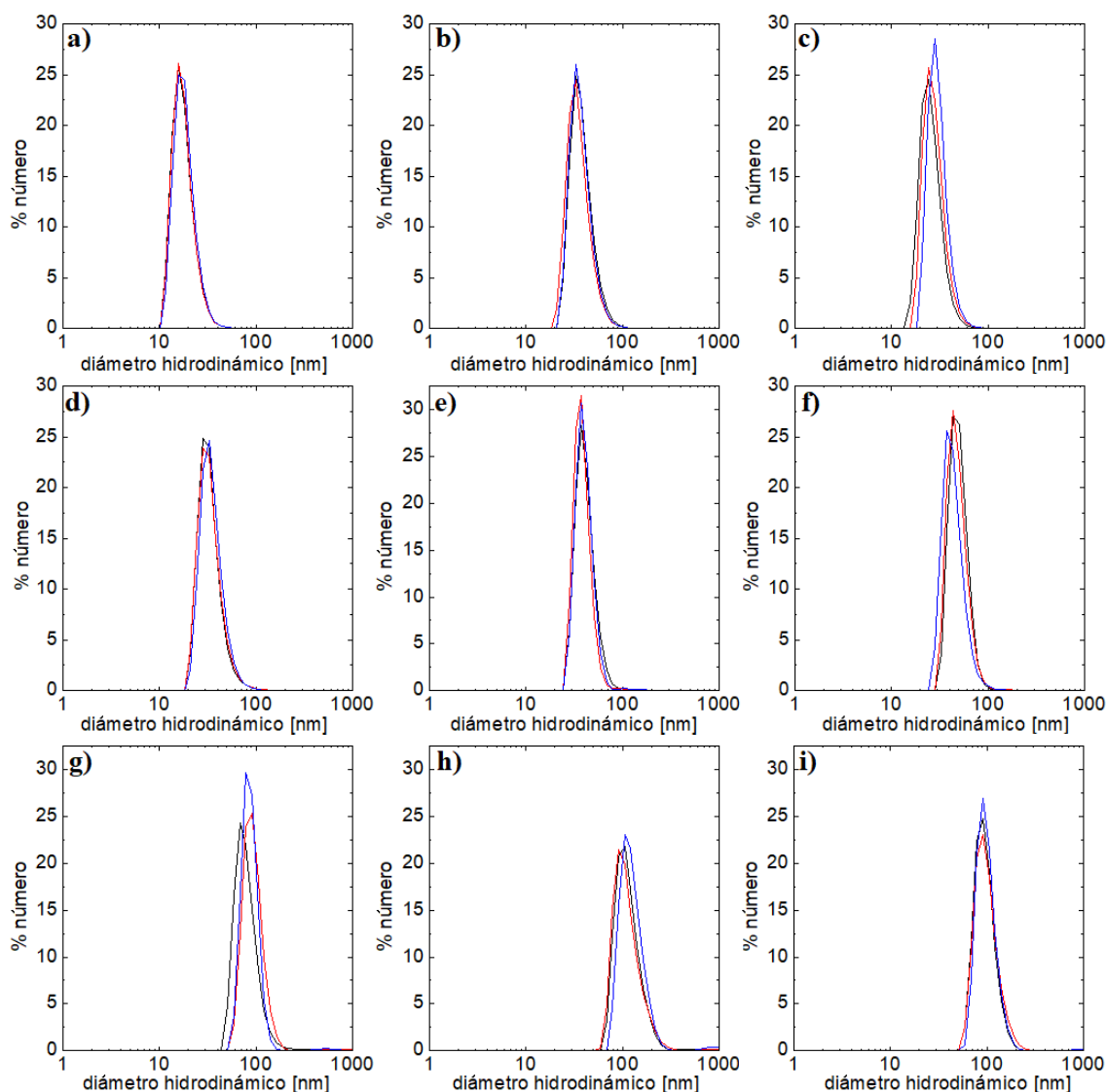


Figura 3.25: Distribuciones de tamaño hidrodinámico de las MNPs en disolución salina de concentración 1.00 M tras a) 0h, b) 24h, c) 72h de incubación; 1.50 M tras d) 0h, e) 24h, f) 72h de incubación; y 2.50 M tras g) 0h, h) 24h, i) 72h de incubación.

La representación gráfica de los valores promedios de los tamaños hidrodinámicos medidos en las distintas disoluciones salinas de diferente concentración frente al tiempo de incubación se muestra en la Figura 3.26. Asimismo, en la misma figura se incluye una representación de los datos correspondientes a las disoluciones salinas de concentraciones más bajas para observar de forma más clara la diferencia de comportamiento de los sistemas de MNPs en el seno de las mismas.

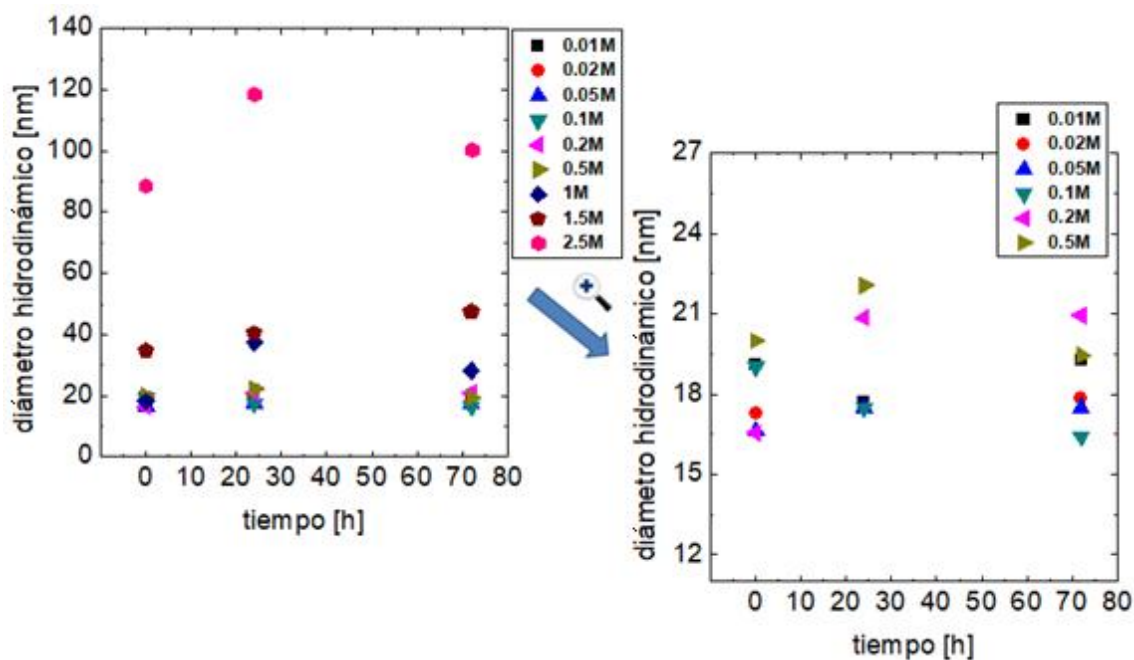


Figura 3.26: Variación del tamaño hidrodinámico de las MNPs con el tiempo en disoluciones salinas con concentraciones en el rango de 0.01 M a 2.50 M. Se muestran los datos sin las barras de incertidumbre correspondientes para una mayor claridad.

En las Tablas 3.9 y 3.10 se muestran los valores promedios de los tamaños hidrodinámicos de las MNPs en los diferentes medios biológicos analizados y en las disoluciones salinas a las distintas concentraciones.

Tabla 3.9: Valores promedio del diámetro hidrodinámico de las MNPs en los diferentes medios biológicos ensayados a los diferentes tiempos de incubación.

	Diámetro hidrodinámico MNPs [nm]			
	0 h	24 h	72 h	96 h
PBS	22.8 ± 5.3	22.7 ± 5.6	26.8 ± 5.7	26.5 ± 5.3
PSF	20.3 ± 5.5	21.3 ± 6.1	25.7 ± 8.0	22.3 ± 6.4
DMEM+glut	24.1 ± 6.4	24.7 ± 8.8	36 ± 14	39 ± 16
DMEM+glut+pen	30.2 ± 7.9	25.2 ± 9.0	31 ± 12	43.5 ± 5.9
DMEM+pen+glut+FBS	31.5 ± 8.8	28.9 ± 8.8	38 ± 10	56.3 ± 7.6

Tabla 3.10: Valores promedio del diámetro hidrodinámico de las MNPs en las las soluciones acuosas de NaCl de diferente concentración a los diferentes tiempos de incubación.

	Diámetro hidrodinámico MNPs [nm]		
	0 h	24 h	72 h
NaCl 0.01M	19.1 ± 5.4	17.7 ± 4.5	19.3 ± 4.9
NaCl 0.02M	17.3 ± 4.6	17.5 ± 4.2	17.8 ± 4.5
NaCl 0.05M	16.6 ± 4.6	17.5 ± 4.9	17.5 ± 4.4
NaCl 0.10M	19.0 ± 4.7	17.5 ± 4.6	16.4 ± 4.6
NaCl 0.20M	16.5 ± 4.5	20.9 ± 5.5	20.9 ± 5.3
NaCl 0.50M	20.0 ± 4.6	22.1 ± 6.0	19.5 ± 5.1
NaCl 1.00M	18.2 ± 5.0	37 ± 11	28.3 ± 7.7
NaCl 1.50M	35 ± 12	41 ± 12	48 ± 14
NaCl 2.50M	88 ± 22	118 ± 35	100 ± 26

Como se puede observar a partir de los diferentes valores obtenidos, las MNPs presentan una estabilidad total tanto en PBS como en PFS, medios en los que el tamaño hidrodinámico de los sistemas coloidales permanece prácticamente constante a lo largo de 96 h de incubación. En DMEM modificado con L-glutamina y con L-glutamina más penicilina/estreptomicina hay una muy ligera tendencia a la agregación de las MNPs desde el inicio y, especialmente, a partir de 72 h de incubación, si bien el incremento del tamaño hidrodinámico medido, que apenas llega a superar los 40 nm en el peor de los casos, no es lo suficientemente alto como para hablar de una pérdida de estabilidad, sino más bien de la existencia de un proceso de asociación de partículas en la forma de dímeros y trímeros en promedio, como se puede deducir de los datos obtenidos. Por su parte, en los ensayos efectuados en DMEM modificado con L-glutamina, penicilina/estreptomicina y FBS se observa esta misma tendencia, si bien en este caso el tamaño hidrodinámico medido tras 96 h de incubación es algo más elevado, por encima de 55 nm, por lo que se concluye que el grado de agregación es ligeramente más elevado. No obstante, en todos estos medios biológicos, incluidos estos últimos basados en DMEM en los que los tamaños hidrodinámicos aumentan ligeramente a los tiempos más largos ensayados, las MNPs visualmente permanecen totalmente estables sin que se formen precipitados en un período de tiempo de varios días de incubación.

Por último, en las disoluciones salinas estudiadas, las MNPs son completamente estables tras 72 h de incubación a concentraciones de NaCl inferiores a 1.00 M, con unos valores de tamaño hidrodinámico de nuevo prácticamente constantes. A las concentraciones de 1.00 M y 1.50 M los tamaños hidrodinámicos empiezan a aumentar dando indicios de pequeños índices de agregación, tras 24 h en la primera de ellas y ya instantáneos en la segunda concentración, respectivamente, aunque al igual que sucedía anteriormente en varios de los DMEM modificados, estos incrementos no son lo suficientemente altos como para hablar de pérdida de estabilidad coloidal. Al aumentar la concentración de la disolución salina a 2.50 M sí se hace evidente la pérdida de estabilidad de las MNPs, tanto a través de un importante incremento en los tamaños hidrodinámicos medidos, por encima de 100 nm, como visualmente a través de la aparición de pequeños precipitados en el fondo del recipiente que contiene la disolución de NPs.

Así pues, se concluye que las MNPs recubiertas con el polímero PMA modificado muestran una perfecta estabilidad coloidal tanto en medios con una pequeña fuerza iónica, como el PBS, como en disoluciones salinas de concentraciones inferiores a 1.00 M. La clara tendencia de las partículas a la agregación en las disoluciones de NaCl de más alta concentración no es un problema de cara a las potenciales aplicaciones biológicas de las MNPs, dado que la concentración salina en el cuerpo humano nunca es superior a ca. 0.15 M^{25} . Por su parte, los estudios de estabilidad en los diferentes medios DMEM suplementados mostraron que sólo en aquel modificado con FBS se produce un incremento destacable del tamaño hidrodinámico tras 96 h de incubación como consecuencia de una ligera tendencia a la agregación de las partículas y/o de un fenómeno de adsorción de proteínas sobre la superficie de las mismas, dando lugar a lo que se conoce como corona proteica²⁶, si bien no llega a ser suficiente como para provocar la pérdida de estabilidad coloidal. Por último, en PSF las MNPs también son completamente estables. De esta forma, se puede concluir que, a nivel de estabilidad coloidal, las MNPs son aptas para su empleo en sistemas biológicos reales de cara a la evaluación de sus potenciales aplicaciones.

3.2.3. Influencia de las condiciones sintéticas y caracterización estructural de MNPs núcleo-coraza

Las MNPs esféricas sintetizadas en apartados anteriores fueron empleadas como semilla para la síntesis de MNPs con estructura núcleo-coraza, generando un crecimiento a su alrededor de capas de material magnético de diferente composición y espesor. Como se explicó en el Capítulo de Introducción, el interés del crecimiento de las corazas magnéticas radica en que permiten modificar la anisotropía de las MNPs de forma más importante que los dopajes, pudiendo de este modo alcanzar un grado de anisotropía “ideal”, el cual da lugar, desde el punto de vista de sus potenciales aplicaciones, a unas propiedades magnéticas más interesantes que las de MNPs de su mismo tamaño y composición, pero sin esta estructura dual^{27,28,29}. Asimismo, estudios previos^{9,30} señalan que, entre los distintos tipos de estas MNPs estudiados, aquellas cuya composición consta de un núcleo formado por un material magnético duro, como el óxido de hierro dopado con cobalto, y una coraza de un material magnético blando, como el óxido de hierro dopado con manganeso (Co@MnMNPs), son las que presentan un mayor interés, dada su elevada potencia magnética. Por ello, en este apartado centraremos nuestro estudio sintético en nanoestructuras núcleo-coraza con esta composición, analizando el efecto de los diferentes tamaños tanto de núcleos como de corazas en las propiedades magnéticas de las partículas resultantes.

En una síntesis típica como la descrita en el apartado de Materiales y Métodos se obtienen Co@MnMNPs con un núcleo de óxido de hierro dopado con cobalto de 7.50 nm de diámetro y una coraza de óxido de hierro dopada con manganeso de 3.50 nm de espesor, de forma que el diámetro global de las estructuras núcleo-coraza es de ca. 14.50 nm. El sistema de MNPs sintetizado presenta un alto grado de monodispersidad, sin presencia de agregados y con una distribución de tamaños estrecha (Figura 3.27a-b). De nuevo, se estudió la estructura cristalina de la partículas obtenidas mediante XRD, obteniéndose los picos de difracción característicos de la estructura de espinela inversa de los óxidos de hierro derivados de la magnetita¹⁷, Fe₃O₄ (Figura 3.27c). Por otra parte, y como ya se ha comentado en el caso de las MNPs esféricas, la diferencia de contraste que se observa entre distintas partículas en las imágenes de TEM puede ser debida a la presencia de MNPs parcialmente oxidadas a consecuencia del proceso de lavado efectuado en ausencia de atmósfera inerte o simplemente a la posición de las MNPs, que pueden estar orientadas según diferentes planos cristalinos¹⁸.

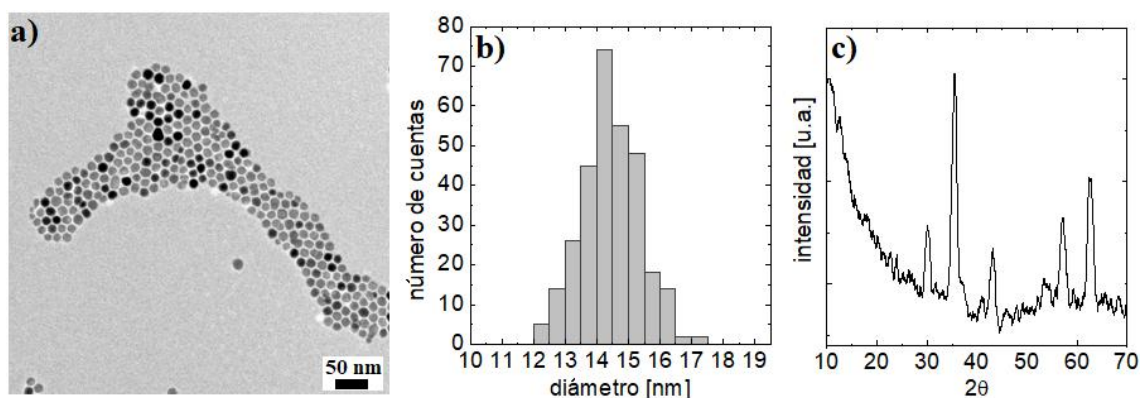


Figura 3.27: a) Imagen TEM, b) histograma de la distribución estadística de tamaños, y c) difractograma de rayos X de las Co@MnMnPs resultantes de una síntesis típica.

3.2.3.1. Síntesis y caracterización de núcleos de diferentes tamaños

De cara a la preparación de los distintos sistemas de Co@MnMnPs se comenzó por sintetizar MNPs de óxido de hierro dopadas con cobalto de diferentes tamaños para que actúen como núcleos en estas nanoestructuras. Siguiendo el protocolo de síntesis de MNPs esféricas y las correspondientes modificaciones en la concentración de los precursores magnéticos, todo ello explicado en apartados anteriores, se lograron obtener MNPs de óxido de cobalto de tres tamaños diferentes: 5.23 nm, 7.50 nm y 13.42 nm (Tabla 3.11 y Figura 3.28). En todos los casos se empleó una razón molar 1:2 entre el precursor de cobalto y el precursor férrico con lo que, dado el grado de incorporación del primero de ellos que fue establecido en MNPs con dopaje simple, se esperaba un porcentaje de incorporación a la estructura de los sistemas de ca. 75-80%.

Tabla 3.11: Cantidades de precursores empleados, tamaños y composiciones de los núcleos de óxido de hierro dopados con cobalto sintetizados.

M (Fe(acac) ₃) [mmol]	M (Co(acac) ₂) [mmol]	V (éter) [ml]	C (Fe+Co) [M]	Tamaño [nm]	Composición ICP-MS
1.0	0.5	18	0.083	(5.23 ± 0.62)	Co _{0.77} Fe _{2.23} O ₄
2.0	1.0	20	0.150	(7.50 ± 0.67)	Co _{0.79} Fe _{2.21} O ₄
2.0	1.0	10	0.300	(13.42 ± 0.94)	Co _{0.55} Fe _{2.45} O ₄

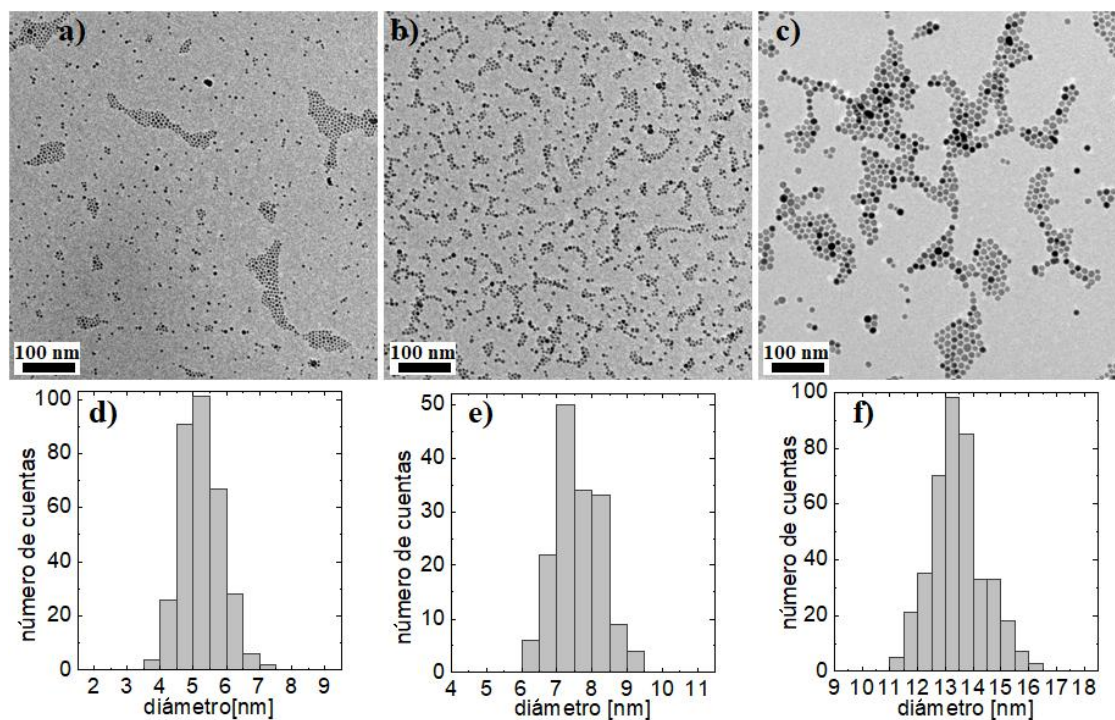


Figura 3.28: Imágenes de TEM e histogramas de las distribuciones estadísticas de tamaños de los núcleos óxido de hierro dopados con cobalto de a) y d) 5.23 nm, b) y e) 7.50 nm, y c) y f) 13.42 nm.

Como se puede ver en la Figura 3.28, los sistemas de MNPs presentan un alto grado de monodispersidad y la forma esférica deseada. Las distribuciones de tamaño son estrechas y los valores promedios se asemejan a los que se esperaban dadas las concentraciones molares empleadas en los procesos sintéticos, en consonancia con los ensayos efectuados a tal efecto en el Apartado 3.2.1. Por su parte, los análisis composicionales de las muestras mediante ICP-MS, cuyos resultados se muestran en la última columna de la Tabla 3.11, muestran un grado de inclusión del cobalto muy similar al esperado en los dos tamaños más pequeños, aproximadamente un 75-80 %, mientras que en las MNPs de 13.42 nm este decae ligeramente, incorporándose tan sólo un 55%, dando lugar a MNPs con estequiometría $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$.

3.2.3.2. Síntesis y caracterización de estructuras núcleo-coraza

A continuación, se prepararon sistemas de MNPs núcleo-coraza con iguales composiciones en ambas partes de la estructura que las obtenidas en la síntesis típica,

pero con diferentes tamaños tanto de los núcleos como de las corazas. El espesor de las corazas de óxido de hierro dopadas con manganeso que se obtienen viene determinado por la razón entre las cantidades de los compuestos precursores de la misma y el número de núcleos que se añaden, por lo que modificando esta última magnitud podemos variar el citado espesor. Experimentalmente, a partir de los resultados de la síntesis típica, se determinó que las cantidades de precursores empleadas para obtener la coraza óxido de manganeso (2 mmol de Fe(acac)₃, 1 mmol de Mn(acac)₂, 2 mmol de ácido oleico, 2 mmol de oleilamina y 10 mmol de 1,2-hexadecanediol) dan lugar a un volumen total de corazas en el sistema de aproximadamente $V_{TC} = 3.7 \cdot 10^{19} \text{ nm}^3$. Este valor se obtiene simplemente multiplicando el volumen de la coraza crecida alrededor de cada núcleo por el número de núcleos añadidos. A partir de este valor se puede calcular fácilmente la cantidad de núcleos a añadir en función de su tamaño para que el espesor de la coraza sea el deseado tras el proceso sintético. Para todo ello, el volumen de una sola coraza de forma esférica se puede obtener mediante la siguiente expresión:

$$V_{1C} = \frac{4}{3} \pi ((R_N + e_C)^3 - R_N^3) \quad (3.2)$$

siendo R_N el radio de los núcleos [nm] y e_C el espesor de las corazas [nm]

Por lo tanto, conocido el volumen total de corazas que obtendremos, dadas las cantidades de precursores de las mismas empleadas, podemos calcular el número de núcleos a añadir para que dichas corazas tengan determinado espesor mediante la siguiente expresión:

$$n^o \text{ núcleos} = \frac{3.73 \cdot 10^{19}}{\frac{4}{3} \pi ((R_N + e_C)^3 - R_N^3)} \quad (3.3)$$

Una vez conocido el número de núcleos sólo es necesario multiplicar esta cantidad por la masa de uno de ellos (m_{1N}) para obtener la masa total de núcleos a añadir (m_N) para obtener los sistemas núcleo-coraza con los tamaños deseados:

$$m_{1N}(g) = \rho_N \frac{4}{3} \pi R_N^3 \quad (3.4)$$

$$m_N(g) = \frac{3.73 \cdot 10^{19}}{(R_N + e_C)^3 - R_N^3} \cdot \rho_N \cdot R_N^3 \quad (3.5)$$

siendo ρ_N la densidad de los núcleos [$\text{g} \cdot \text{nm}^{-3}$] en las dos ecuaciones anteriores.

A partir de los núcleos de óxido de hierro dopados con cobalto de diferentes tamaños previamente preparados se sintetizaron las distintas Co@MnMNP_s (Figuras 3.29) añadiendo, para ello, las cantidades de núcleos determinadas a partir de la expresión 3.5.

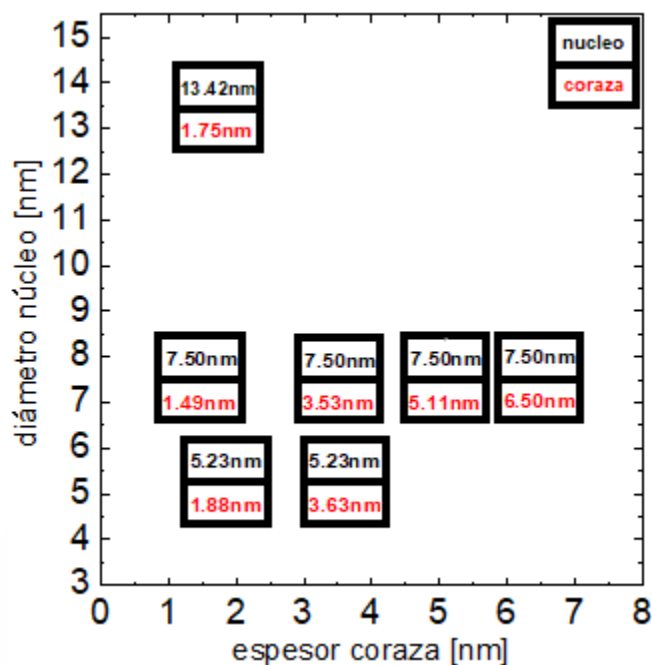


Figura 3.29: Esquema de los tamaños de núcleo y espesores de coraza de las diferentes Co@MnMNP_s sintetizadas.

En la Tabla 3.12 se recogen los datos de la cantidad de núcleos de óxido hierro modificados con cobalto añadidos en cada síntesis, así como los tamaños de las corazas esperados y los finalmente medidos en los sistemas de MNP_s sintetizados. Mediante diversas pruebas experimentales preliminares, se determinó que, a fin de evitar un crecimiento no uniforme de las corazas en todas las MNP_s, con la consecuente pérdida de la morfología esférica, en las síntesis con núcleos de óxido de hierro dopado con cobalto de 5.23 nm de diámetro conviene reducir el volumen de éter bencílico de 20 ml a 12 ml, manteniendo iguales las cantidades del resto de reactivos para la síntesis de este tipo de estructuras, mientras que en las síntesis con núcleos con un tamaño de 13.42 nm este volumen debe ser incrementado a 40 ml. En la Figura 3.30, por su parte, se muestran las imágenes de TEM de los diferentes sistemas de Co@MnMNP_s sintetizados.

Tabla 3.12: Tamaños de núcleo y espesores de coraza obtenidos de las Co@MnMNPs sintetizadas, masas de núcleos añadidas para las síntesis, y espesores de coraza esperados.

Diámetro núcleo [nm]	Espesor coraza [nm]	Masa núcleos añadida [mg]	Espesor coraza esperado [nm]
5.23	1.88	47.9	1.90
	3.63	16.5	3.50
7.50	1.49	99.9	1.50
	3.53	30.0	3.50
	5.11	15.0	5.25
	6.50	8.3	7.00
13.42	1.75	76.0	3.50

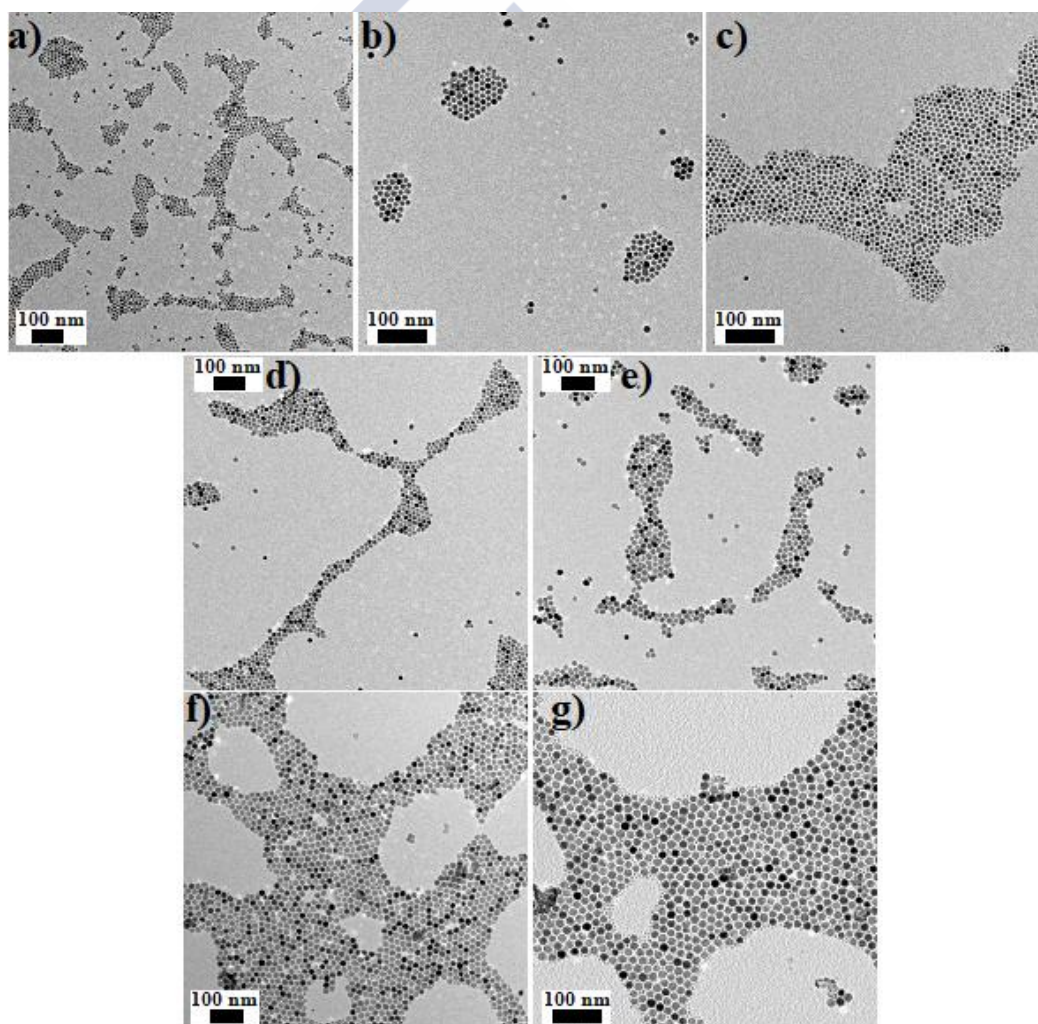


Figura 3.30: Imágenes TEM de las MNPs con diámetro núcleo - espesor coraza de: a) 5.23 nm-1.88 nm, b) 5.23 nm-3.63 nm, c) 7.50 nm-1.49 nm, d) 7.50 nm-3.53 nm, e) 7.50 nm-5.11 nm, f) 7.50 nm-6.50 nm y g) 13.42 nm-1.75 nm.

Las imágenes de TEM de las diferentes muestras (Figura 3.30) revelan que las Co@MnMnPs obtenidas son altamente monodispersas. Además, se comprueba que los espesores de las corazas obtenidos son muy similares a los que se pretendían en base a los cálculos expuestos anteriormente (Tabla 3.12), por lo que se puede confirmar que, en general, el método matemático desarrollado funciona correctamente. Únicamente en el sistema ensayado con núcleos de 13.42 nm se observa una notable diferencia entre el espesor de la coraza pretendido y el que finalmente se obtuvo, dado que se añadió una cantidad de núcleos con la que se pretendía crecer una coraza de 3.50 nm y esta solo alcanzó 1.75 nm. El problema, en este caso, estuvo en la nucleación de parte de los compuestos precursores de la coraza, que dieron lugar a partículas independientes de tamaño muy reducido en lugar de incorporarse a la estructura de las Co@MnMnPs (Figura 3.30g). Se llevaron a cabo varios ensayos modificando distintos parámetros del proceso sintético, tales como el tiempo de reacción o el volumen de éter bencílico a fin de intentar corregir esta divergencia, pero las diferencias entre los resultados obtenidos no fueron significativas, y en ningún caso se logró la inclusión total del material precursor de la coraza en la estructura de los sistemas núcleo-coraza. Adicionalmente, se efectuaron diversas pruebas para intentar lograr corazas más gruesas sobre los núcleos de 13.42 nm y, en ellas, el fenómeno de la nucleación de los compuestos precursores del recubrimiento se hacía aún más evidente, dando lugar a sistemas totalmente polidispersos, tal y como se puede ver en la Figura 3.31. Asimismo, en la muestra en la que se han crecido unas corazas de 1.49 nm sobre los núcleos de 7.50 nm también se pueden observar pequeños fenómenos de nucleación de los materiales precursores de las corazas (Figuras 3.30c), si bien en este caso son mucho menos significativos que los sucedidos en las Co@MnMnPs con núcleo de 13.42 nm.

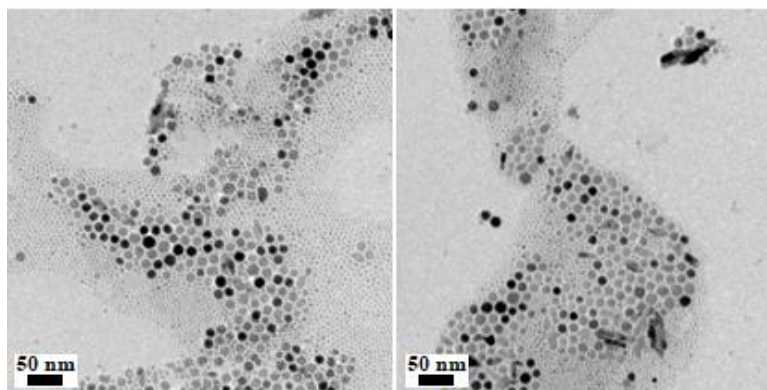


Figura 3.31: Imágenes TEM de los ensayos de crecimientos de corazas de alto espesor sobre núcleos de óxido de cobalto de 13.42 nm mostrando graves problemas de nucleación.

Una posible hipótesis que explica este comportamiento anómalo en el crecimiento de los recubrimientos magnéticos sobre los núcleos de mayor tamaño es la dificultad de los precursores de la coraza para constituirse inicialmente en monocapas de elevada área superficial como las necesarias para recubrir a estos núcleos de diámetro elevado. Al tardar estas primeras monocapas de la coraza más tiempo del habitual en constituirse, las sucesivas no lo hacen dentro del tiempo de reacción establecido y, durante el mismo, los precursores que no se incorporan a la estructura de las MNPs tienden a nuclearse formando pequeños agregados como los que se observan en las imágenes de TEM. Esta hipótesis también explica que los ensayos efectuados intentando crecer corazas de mayor tamaño sobre estos núcleos de 13.42 nm de diámetro, o las pruebas aumentando el tiempo de reacción dieran lugar a sistemas de MNPs en los que se reproducían de forma muy similar los problemas de nucleación ya explicados.

En aquellos sistemas de MNPs tras cuyas síntesis las imágenes de TEM mostraron la presencia de nucleación de los componentes precursores de la coraza, este material nucleado en forma de partículas de muy pequeñas dimensiones es fácilmente eliminable, de tal modo que los sistemas finales presenten un elevado grado de monodispersidad, con una sola población en lo referente a los tamaños de las MNPs constituyentes. Para ello, simplemente es necesario dispersar las MNPs ya lavadas en tolueno, añadir una pequeña cantidad de etanol (aproximadamente un 20-25% en volumen) y colocar la disolución sobre un imán. Tras unos minutos las MNPs de mayor tamaño precipitarán atraídas por el imán, mientras que el material nucleado permanecerá en el sobrenadante dotando a este de un color turbio. Así, si descartamos el sobrenadante el material nucleado será eliminado, quedándonos solo con las MNPs de mayor tamaño que presentan la estructura núcleo-coraza deseada. En la Figura 3.32 se muestran las imágenes de TEM de las MNPs con estructura núcleo-coraza en las que hubo problemas de nucleación antes y después de efectuarles este tratamiento. En ellas se comprueba que la eliminación de los materiales precursores del recubrimiento que nuclearon formando MNPs de tamaño muy reducido se lleva a cabo de forma altamente exitosa.

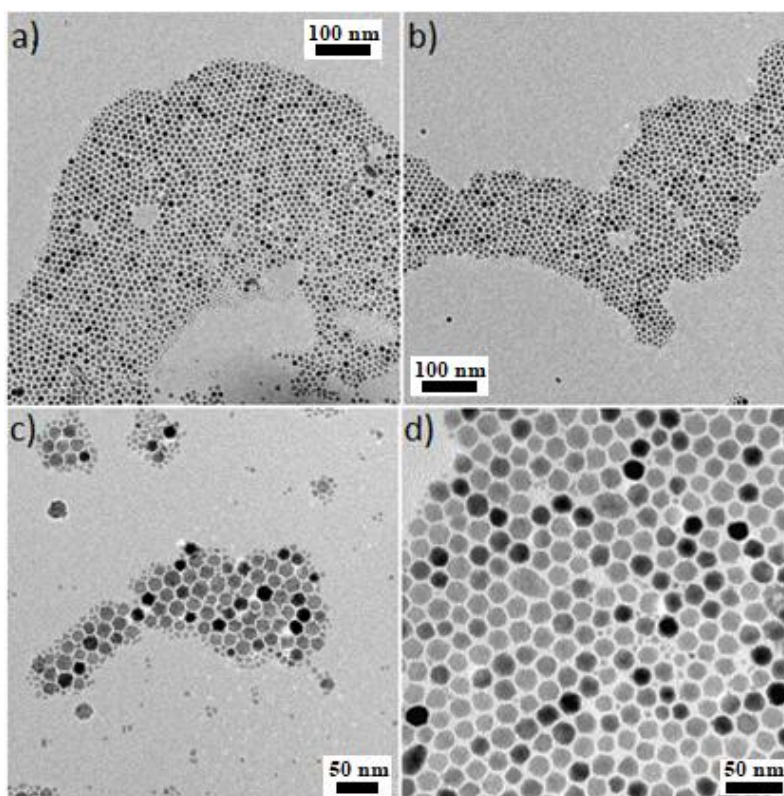


Figura 3.32: Imágenes de TEM de nanopartículas núcleo-coraza con nucleación colateral antes y después de eliminar el material nucleado: Co@MnMnPs con núcleo de 7.50 nm y coraza de 1.49 nm (a) antes y b) después del proceso de separación, Co@MnMnPs con núcleo de 13.42 nm y coraza de 1.75 nm (c) antes y d) después del proceso de separación.

La composición de las diferentes nanopartículas núcleo-coraza fue determinada, nuevamente, por ICP-MS. Dado que se conocen tanto la composición de los núcleos como los volúmenes de estos y de las corazas que se crecen, los resultados de ICP-MS nos permiten no solo conocer la composición global de las diferentes Co@MnMnPs, sino que podemos emplearlos para calcular la composición de la coraza de modo individual. Esto se puede realizar mediante la expresión 3.6, otorgando peso estadístico a las distintas estequiometrías resultantes de los análisis de ICP-MS según los volúmenes de las diferentes partes de los sistemas de MNPs:

$$V_{NC} \cdot X_{NC} = V_N \cdot X_N + V_C \cdot X_C \rightarrow X_C = \frac{V_{NC} \cdot X_{NC} - V_N \cdot X_N}{V_C} \quad (3.6)$$

dónde X_C , X_N , X_{NC} son las estequiometrías del elemento X en la coraza, el núcleo y en la estructura núcleo-coraza, respectivamente; y V_C , V_N , V_{NC} corresponden a los volúmenes de la coraza, el núcleo y de la estructura núcleo-coraza, respectivamente.

Si desarrollamos las expresiones de los volúmenes de las diferentes partes de las nanoestructuras en función del diámetro de los núcleos y el espesor de las corazas, la ecuación anterior toma la siguiente forma:

$$X_C = \frac{(R_N + e_s)^3 \cdot X_{NC} - R_N^3 \cdot X_N}{(R_N + e_s)^3 - R_N^3} \quad (3.7)$$

dónde R_N es el radio del núcleo y e_s el espesor de la coraza.

En la Tabla 3.13 se muestran las composiciones de las distintas Co@MnMNPs sintetizadas obtenidas a partir de las medidas de ICP-MS, así como las composiciones de los núcleos y las corazas por separado calculadas mediante las anteriores expresiones.

Tabla 3.13: Composiciones de núcleos y corazas en las diferentes sistemas de Co@MnMNPs.

Diámetro núcleo [nm]	Espesor coraza [nm]	Composición ICP-MS	Composición ICP-MS núcleo	Composición ICP-MS coraza
5.23	1.88	Co _{0.10} Mn _{0.42} Fe _{2.48} O ₄	Co _{0.77} Fe _{2.23} O ₄	Mn _{0.49} Fe _{2.51} O ₄
	3.63	Co _{0.04} Mn _{0.32} Fe _{2.64} O ₄	Co _{0.77} Fe _{2.23} O ₄	Mn _{0.35} Fe _{2.65} O ₄
7.50	1.49	Co _{0.20} Mn _{0.40} Fe _{2.40} O ₄	Co _{0.79} Fe _{2.21} O ₄	Mn _{0.59} Fe _{2.41} O ₄
	3.53	Co _{0.09} Mn _{0.35} Fe _{2.56} O ₄	Co _{0.79} Fe _{2.21} O ₄	Mn _{0.40} Fe _{2.60} O ₄
	5.11	Co _{0.04} Mn _{0.40} Fe _{2.86} O ₄	Co _{0.79} Fe _{2.21} O ₄	Mn _{0.42} Fe _{2.58} O ₄
	6.50	Co _{0.02} Mn _{0.75} Fe _{2.23} O ₄	Co _{0.79} Fe _{2.21} O ₄	Mn _{0.77} Fe _{2.23} O ₄
13.42	1.75	Co _{0.19} Mn _{0.37} Fe _{2.44} O ₄	Co _{0.55} Fe _{2.45} O ₄	Mn _{0.65} Fe _{2.35} O ₄

Observamos que los porcentajes de incorporación del manganeso a la estructura cristalina de las corazas varía desde el 35% en las Co@MnMNPs con núcleo de 5.23 nm y coraza de 3.63 nm de tamaño hasta el 77% del sistema con núcleo de 7.50 nm y coraza de 6.50 nm. A pesar de que estos dos extremos delimitan un intervalo de porcentajes de incorporación muy amplio, lo cierto es que la mayoría de los valores obtenidos se encuentran próximos al 50%, que es el valor esperado tras los ensayos de dopajes simples con manganeso efectuados en las MNPs esféricas de aproximadamente 8 nm mostrados con anterioridad. Si relacionamos el porcentaje de inclusión del

manganeso con la razón entre los volúmenes de núcleo y coraza de cada estructura (Figura 3.33) se observa una clara tendencia descendente, es decir, cuanto mayor es el cociente entre el volumen de la coraza y el volumen del núcleo menor es la cantidad de manganeso que se incorpora al recubrimiento magnético. Por tanto, se puede concluir una mayor facilidad de que el manganeso se incorpore correctamente a la estructura del recubrimiento cuando el tamaño relativo de este es bajo. Este comportamiento sólo deja de cumplirse de forma evidente en las Co@MnMNPs con núcleo de 7.50 nm y coraza de 6.50 nm, que son las que presentan el cociente entre volúmenes más elevado (aproximadamente 19.4) y, sin embargo, también son las que incluyeron un mayor porcentaje del precursor de manganeso en su estructura (77%).

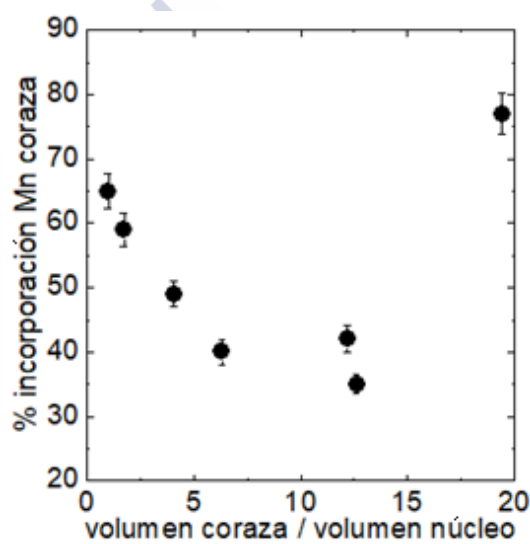


Figura 3.33: Representación gráfica del porcentaje de incorporación de manganeso a la estructura de las corazas (dadas las razones entre precursores) frente a la razón entre los volúmenes de coraza y núcleo.

Además de todas las Co@MnMNPs detalladas hasta el momento, también se efectuaron dos síntesis modificando las composiciones de las dos partes de este tipo de nanoestructuras, variando la razón molar estándar entre precursores de 1:2 entre cobalto y hierro en el caso de los núcleos, y entre manganeso y hierro en el caso de las corazas. Así, por una parte, se preparó una estructura con núcleo de óxido de hierro dopado con cobalto de 7.50 nm y coraza de óxido de hierro dopada con manganeso de aproximadamente 3.50 nm, pero modificando, en este caso, la razón molar entre los precursores de manganeso y de hierro de la coraza a 1:1 (NPs 1). Por otra parte, también

se sintetizó una estructura núcleo-coraza usando como núcleos las MNPs con dopaje triple de composición $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ y un diámetro de 8.48 nm, intentando crecer a su alrededor una coraza de espesor aproximado de 3.50 nm e igual composición (NPs2). Con estos ensayos se pretendió averiguar la capacidad de modificación de la composición de las corazas en las Co@MnMNPs así como estudiar la posibilidad de sintetizar estructuras de este tipo que incluyan en las distintas partes de su estructura dual todos los elementos dopantes con los que se ha trabajado. En la Tabla 3.14 se recogen las distintas cantidades de precursores magnéticos empleadas en las síntesis de los núcleos y en el posterior crecimiento de las corazas en estas dos tipologías de NPs. Las cantidades del resto de reactivos no variaron respecto a las ya expuestas anteriormente.

Tabla 3.14: Cantidades de precursores magnéticos de los núcleos y de las corazas empleados en las síntesis de NPs 1 y NPs 2.

		Fe(acac)₃ [mmol]	Mn(acac)₂ [mmol]	Co(acac)₂ [mmol]	Zn(acac)₂ [mmol]
NPs 1	Núcleo	2.00	-	1.00	-
	Coraza	1.50	1.50	-	-
NPs 2	Núcleo	1.50	0.60	0.30	0.60
	Coraza	1.50	0.60	0.30	0.60

Los sistemas obtenidos tras estos procesos sintéticos no presentan apenas problemas de aglomeración y las MNPs constituyentes muestran la forma esférica deseada (Figura 3.34). Respecto a los tamaños de las corazas, estos son próximos a los esperados, en función de las cantidades de núcleos y de precursores añadidas en base a los cálculos efectuados. En el caso de la coraza de óxido de manganeso el tamaño es prácticamente idéntico al pretendido, mientras que en la coraza con los tres elementos dopantes obtenemos un espesor de 3.14 nm cuando el deseado era de 3.50 nm (Tabla 3.15). Esta ligera caída del espesor es consistente con las pequeñas MNPs que se observan en muy baja proporción en la imagen TEM de esta muestra (Figura 3.34b), con total probabilidad consistentes en materiales precursores que nuclearon y no pasaron a formar parte de la coraza.

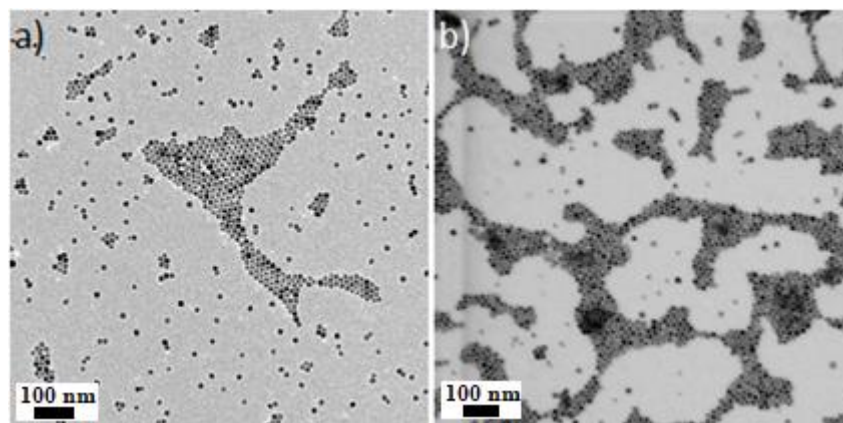


Figura 3.34: Imágenes de TEM de las estructuras núcleo-coraza de a) NPs 1 y b) NPs 2.

Tabla 3.15: Masas de núcleos añadidas para las síntesis, y espesores de coraza esperados y obtenidos en las estructuras núcleo-coraza de NPs 1 y NPs 2.

	Espesor coraza [nm]	Masa núcleos añadida [mg]	Espesor coraza esperado [nm]
NPs 1	3.49	30.0	3.50
NPs 2	3.14	37.6	3.50

Por su parte, la composición de los dos tipos de NPs fue determinada mediante ICP-MS (Tabla 3.16). Como se comentó anteriormente, al conocer esta composición global, así como la composición de los núcleos y los volúmenes de estos y de las corazas, se puede determinar la composición estequiométrica de las corazas mediante un sencillo cálculo. En el caso de las MNPs con núcleo y coraza con triple dopaje se observa que, tal y como se pretendía dadas las cantidades de precursores magnéticos empleadas, las composiciones de las dos partes de la nanoestructura tienen una composición muy similar ($\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ los núcleos y $\text{Zn}_{0.29}\text{Co}_{0.32}\text{Mn}_{0.18}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ las corazas). Las presencias de zinc y de cobalto aumentan ligeramente, mientras que las de manganeso y hierro decrecen, pero las diferencias son prácticamente despreciables. Por su parte, en las MNPs con núcleo de óxido de cobalto y coraza de óxido de manganeso con razón 1:1 entre los precursores de hierro y de manganeso, los cálculos efectuados a partir de la medida composicional de ICP-MS determinan que la estequiometría de la coraza es $\text{Mn}_{0.45}\text{Fe}_{2.55}\text{O}_4$, es decir, el porcentaje de incorporación del manganeso en la estructura de la coraza fue de apenas un 30%, bastante alejado del

valor aproximado del 50% que esperábamos dados todos los ensayos previos con dopajes simples con manganeso. Si comparamos este sistema de MNPs con el de similares dimensiones sintetizado con los mismos núcleos, pero con la razón habitual de 1:2 entre los precursores de manganeso e hierro para la coraza, vemos que la estequiometría de esta apenas ha variado, pasando de $\text{Mn}_{0.40}\text{Fe}_{2.55}\text{O}_4$ a $\text{Mn}_{0.45}\text{Fe}_{2.55}\text{O}_4$, por lo que se concluye que de cara a cambiar el porcentaje de manganeso de una coraza sin variar su tamaño son necesarias variaciones más importantes en las razones entre los precursores magnéticos.

Tabla 3.16: Composiciones de núcleos y corazas determinadas mediante ICP-MS en las estructuras núcleo-coraza NPs 1 y NPs 2.

Diámetro núcleo [nm]	Espesor coraza [nm]	Composición ICP-MS	Composición ICP-MS núcleo	Composición ICP-MS coraza
7.50	3.49	$\text{Co}_{0.11}\text{Mn}_{0.39}\text{Fe}_{2.50}\text{O}_4$	$\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$	$\text{Mn}_{0.45}\text{Fe}_{2.55}\text{O}_4$
8.41	3.14	$\text{Zn}_{0.28}\text{Co}_{0.32}\text{Mn}_{0.18}\text{Fe}_{2.22}$	$\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}$	$\text{Zn}_{0.29}\text{Co}_{0.32}\text{Mn}_{0.18}\text{Fe}_{2.21}$

Una vez sintetizados los diferentes sistemas y estudiado como se puede modificar el tamaño y la composición de las diferentes partes de la estructura dual de las nanoestructuras núcleo-coraza, se estudió mediante XRD si los sistemas sintetizados mantenían la estructura cristalina. Anteriormente ya se obtuvo el espectro de XRD de las Co@MnMNPs sintetizadas tras la denominada síntesis típica, consistentes en un núcleo de óxido hierro modificado con cobalto de 7.50 nm de diámetro y una coraza de óxido de hierro modificada con manganeso de 3.50 nm de espesor, y los picos característicos de las mismas demostraron que la estructura cristalina predominante era la de la magnetita. Adicionalmente, se midieron los difractogramas de otros dos sistemas de MNPs con estructura núcleo-coraza, ambos con núcleos de 7.50 nm y con corazas de espesores aproximados de 1.50 nm y 6.50 nm, respectivamente. De esta forma, se analizó si el crecimiento de corazas en un rango amplio de espesores afecta a la estructura cristalina de los nanosistemas resultantes. En la Figura 3.35 se muestran los difractogramas de rayos X de los dos sistemas de Co@MnMNPs estudiados.

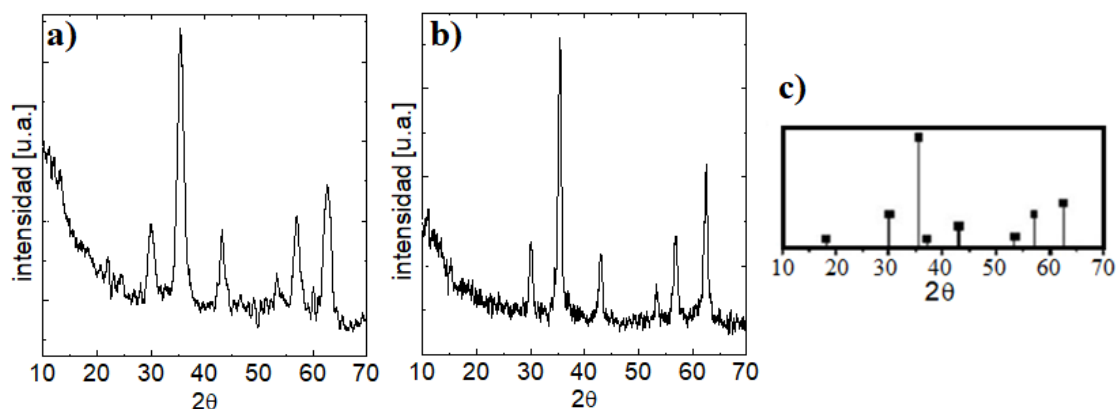


Figura 3.35: Difractogramas de rayos X de las Co@MnMnPs con: a) núcleo de 7.50 nm y coraza de 1.50 nm, y b) núcleo de 7.50 nm y coraza de 6.50 nm. c) Representación esquemática de las posiciones e intensidad relativa de los picos de difracción de rayos X de la estructura cristalina de la magnetita determinadas teóricamente.

Las posiciones de los picos de difracción en las dos muestras analizadas con estructura núcleo-coraza indican que ambas presentan la estructura cristalina de la magnetita. Así pues, se puede concluir que todos los sistemas sintetizados en este capítulo, tanto las ferritas de un diámetro aproximado de 8 nm con diferentes dopajes simples, dobles y triples con manganeso, cobalto y zinc, como las estructuras núcleo-coraza con diferentes tamaños y composiciones de cada una de las partes de su estructura dual, presentan la estructura cristalina de la magnetita, Fe_3O_4 . Los diferentes elementos metálicos utilizados como agentes dopantes se introducen en la arquitectura de las MNPs sustituyendo a los átomos de hierro, pero sin alterar la estructura cristalina, cosa que tampoco sucede al crecer corazas magnéticas alrededor de los núcleos magnéticos¹⁷.

3.2.4. Transferencia a medio acuoso y estabilidad de las MNPs con estructura núcleo-coraza

Al igual que se hizo con todas las MNPs de aproximadamente 8-9 nm de tamaño sintetizadas en apartados anteriores, las diferentes estructuras núcleo-coraza también fueron funcionalizadas, para su correcta dispersión en medio acuoso, mediante un recubrimiento polimérico con PMA modificado con dodecilamina, siguiendo el protocolo explicado en la sección de Materiales y Métodos¹³. Al tener en esta ocasión

sistemas de MNPs de tamaños más elevados, que en algunos casos alcanzan los 20 nm de diámetro, resultó necesario modificar la cantidad de monómeros de PMA por unidad de superficie libre de las MNPs a añadir, utilizando las cantidades expuestas previamente en la Tabla 3.1 que fueron determinadas experimentalmente. Una vez efectuada la modificación superficial y la consiguiente dispersión en medio acuoso, se estudiaron la potencial existencia de agregación y la estabilidad coloidal de los distintos tipos de MNPs núcleo-coraza en agua mediante la determinación de sus tamaños hidrodinámicos y sus valores de potencial ζ .

3.2.4.1. Estudio de las MNPs con estructura núcleo-coraza transferidas a medio acuoso mediante medidas de DLS

En primera instancia, la hipotética existencia de agregación de las MNPs constituyentes de los sistemas, tras ser transferidos estos a medio acuoso, fue evaluada mediante medidas del tamaño hidrodinámico. En la Figura 3.36 se representan las distribuciones de tamaño hidrodinámico de cada una de las estructuras núcleo-coraza sintetizadas, obtenidas mediante DLS (tres medidas representadas para cada muestra), mostrándose los valores promedios en la Tabla 3.17. Las nueve estructuras núcleo-coraza estudiadas deparan resultados de DLS satisfactorios. En primer lugar, las distribuciones estadísticas de los distintos tamaños hidrodinámicos medidos presentan, en general, un solo pico bastante estrecho, lo cual resulta indicativo de la existencia de una sola población de MNPs, con un alto grado de monodispersidad y sin problemas relevantes de agregación tras la realización del recubrimiento polimérico y la transferencia de los sistemas a medio acuoso. Por su parte, los valores promedios de los tamaños hidrodinámicos de las distintas muestras (cuarta columna de la Tabla 3.17) son totalmente razonables, no denotando en ningún caso la presencia de fenómenos de agregación de las MNPs. Nótese que, además del tamaño de la parte inorgánica de las estructuras núcleo-coraza, hay que considerar el recubrimiento polimérico, cuyo espesor fue estimado en torno a 2-4 nm en base a las imágenes de TEM que se obtuvieron de las ferritas dopadas una vez funcionalizadas. Por otro lado, como ya se comentó en apartados previos, debe tenerse en cuenta que, al encontrarse los sistemas de MNPs en disolución acuosa, se produce un fenómeno de estiramiento de las cadenas hidrófilas del polímero, lo que da pie a un aumento de varios nanómetros en los valores del tamaño

hidrodinámico²². En base a todo ello, se puede concluir que los resultados que se obtuvieron son altamente consistentes con el hecho de que los recubrimientos poliméricos efectuados no indujeron ningún tipo de agregación sobre las diferentes MNPs con estructura núcleo-coraza estudiadas.

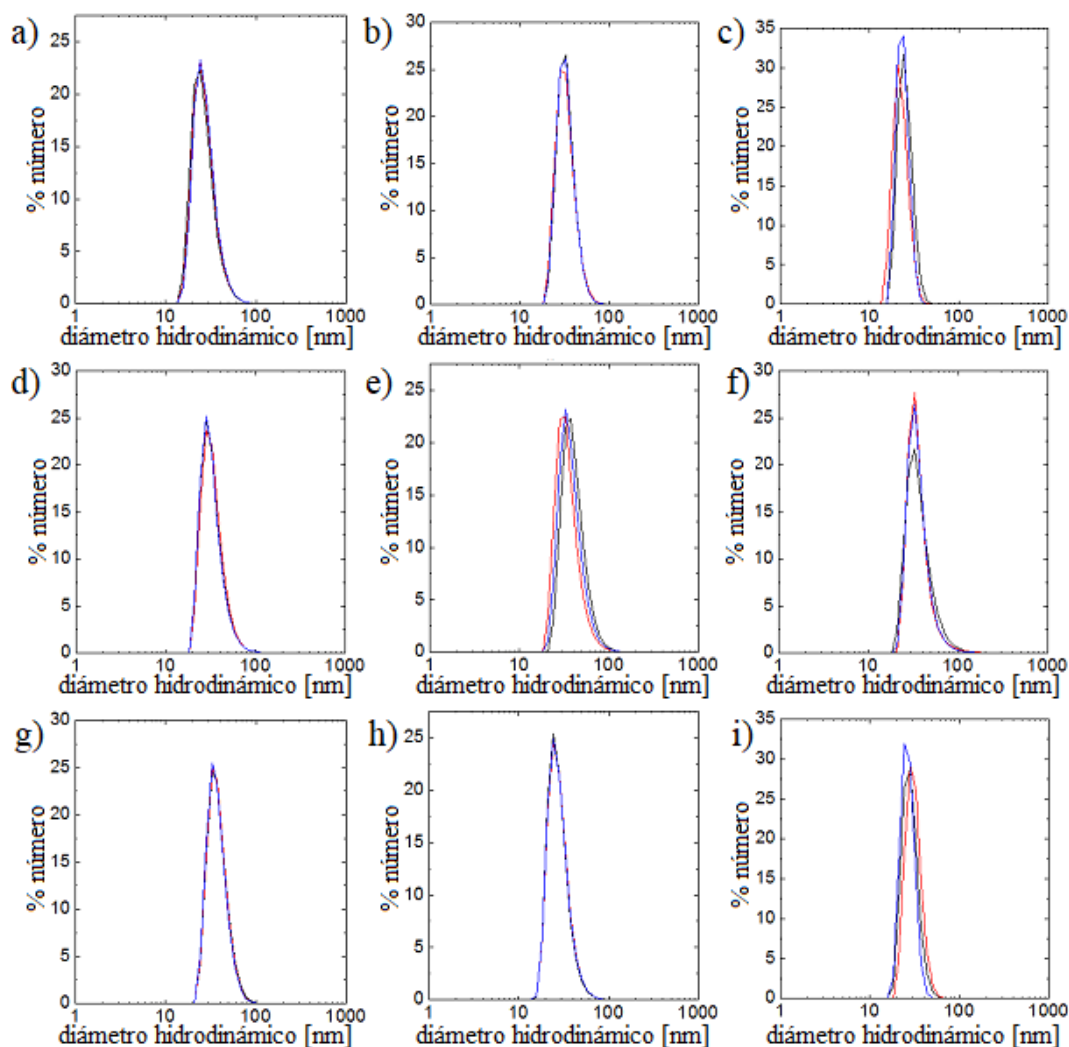
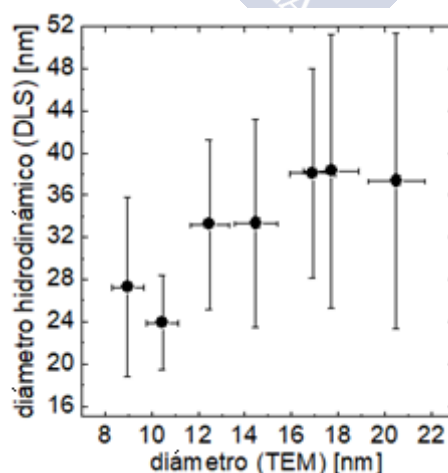


Figura 3.36: Distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico determinadas mediante medidas de DLS de las Co@MnMNPs con los siguientes tamaños de núcleo - espesor coraza: a) 5.23 nm-1.88 nm, b) 5.23 nm-3.63 nm, c) 7.50 nm-1.49 nm, d) 7.50 nm-3.53 nm, e) 7.50 nm-5.11 nm, f) 7.50 nm-6.50 nm, g) 13.42 nm-1.75 nm; h) estructura núcleo-coraza NPs1, i) estructura núcleo-coraza NPs 2.

Tabla 3.17: Valores promedio de los tamaños hidrodinámicos de las diferentes partículas núcleo-coraza y de sus diámetros en fase orgánica.

FASE ORGÁNICA			FASE ACUOSA	Composición ICP-MS Coraza
Diámetro núcleo [nm]	Espesor coraza [nm]	Tamaño MNPs [nm]	Diámetro hidrodinámico [nm]	
5.23	1.88	8.98 ± 0.69	27.3 ± 8.5	$\text{Mn}_{0.49}\text{Fe}_{2.51}\text{O}_4$
	3.63	12.49 ± 0.82	33.2 ± 8.0	$\text{Mn}_{0.35}\text{Fe}_{2.65}\text{O}_4$
7.50	1.49	10.48 ± 0.68	23.9 ± 4.5	$\text{Mn}_{0.59}\text{Fe}_{2.41}\text{O}_4$
	3.53	14.46 ± 0.91	31.3 ± 9.0	$\text{Mn}_{0.40}\text{Fe}_{2.60}\text{O}_4$
	5.11	17.7 ± 1.2	38 ± 13	$\text{Mn}_{0.42}\text{Fe}_{2.58}\text{O}_4$
	6.50	20.5 ± 1.2	37 ± 14	$\text{Mn}_{0.77}\text{Fe}_{2.23}\text{O}_4$
13.42	1.75	16.9 ± 1.0	38.1 ± 9.9	$\text{Mn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$
7.50	3.49	14.48 ± 0.95	29.2 ± 8.1	$\text{Mn}_{0.45}\text{Fe}_{2.55}\text{O}_4$
8.48	3.14	14.76 ± 0.80	30.9 ± 7.5	$\text{Zn}_{0.29}\text{Co}_{0.32}\text{Mn}_{0.18}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$

Si se representan los tamaños hidrodinámicos anteriores frente a los tamaños de las partes inorgánicas de las MNPs medidos en las imágenes de TEM se observa que ambas magnitudes aumentan de forma simultánea, haciéndolo además de una forma consistente para la práctica totalidad de los sistemas (Figura 3.37). Por ello, los datos obtenidos mediante DLS se pueden considerar congruentes con conjuntos de MNPs monodispersos y sin agregación.

**Figura 3.37:** Representación gráfica de los tamaños hidrodinámicos de las Co@MnMNPs obtenidos mediante DLS frente a los tamaños medidos en las imágenes de TEM.

3.2.4.2. Estudio de las MNPs con estructura núcleo-coraza transferidas a medio acuoso mediante la determinación del potencial ζ

Tras varias semanas de incubación en medio acuoso, las nanoestructuras núcleo-coraza con el recubrimiento de PMA-dodecilamina se mostraron completamente estables, lo cual indica de forma fehaciente que dicho recubrimiento polimérico se ha efectuado correctamente, pues de otra forma la naturaleza hidrófoba de las cadenas de ácido oleico y oleilamina originalmente ocupaban la superficie de las partículas harían que estas precipitasen rápidamente. Para comprobar con datos experimentales este correcto recubrimiento, se midieron las movilidades electroforéticas de las nueve estructuras núcleo-coraza sintetizadas, a partir de las cuales se obtuvieron las distribuciones estadísticas de potencial ζ . Al igual que en las medidas del tamaño hidrodinámico, para la determinación del potencial ζ también se midieron tres distribuciones independientes en cada muestra (Figura 3.38), a partir de las cuales se obtuvieron los valor promedios mostrados en la Tabla 3.18.

Del mismo modo que sucedía con las distribuciones estadísticas de los tamaños hidrodinámicos, las gráficas de potencial zeta de las distintas estructuras núcleo-coraza también presentan un solo pico, siendo además estos lo suficientemente estrechos como para considerar un recubrimiento uniforme de todas las MNPs que conforman cada sistema. Tan solo en la muestra constituida por Co@MnMNPs con núcleos de óxido de cobalto de 5.23 nm y corazas de óxido de manganeso de 1.88 nm (Figura 3.37a) y, en menor medida, en la de MNPs con tamaños de sus partes constituyentes de 7.50 nm y 5.11 nm (Figura 3.37e), las anchuras de los picos de potencial zeta son ligeramente superiores a las observadas en los demás sistemas, lo cual se traduce en unas altas incertidumbres en los valores promedio de dicha magnitud, si bien no son lo suficientemente elevadas como para considerarlas unas malas distribuciones. Así pues, se puede concluir que cada uno de los nueve sistemas estudiados presenta un recubrimiento polimérico altamente uniforme en todas las MNPs que los conforman. Respecto a los valores promedio de potencial zeta resultantes de las citadas distribuciones estadísticas, estos se encuentran todos dentro del intervalo comprendido entre -55 mV y -75 mV. Dados los importantes márgenes de incertidumbres de estas medidas, se puede afirmar que los valores medios de potencial zeta de los diferentes sistemas magnéticos son prácticamente coincidentes. Como se explicó para el caso de

las MNPs dopadas de aproximadamente 8-9 nm de diámetro, los potenciales zeta negativos y con valores similares a los obtenidos están dentro del rango determinado previamente para otros nanosistemas recubiertos con este mismo compuesto que presentaban tamaños semejantes^{9,23} así como con el signo de la carga de los grupos funcionales presentes en la superficie libre de las estructuras núcleo-coraza una vez que estas han sido funcionalizadas con el complejo PMA-dodecilamina para su transferencia a medios biológicos.

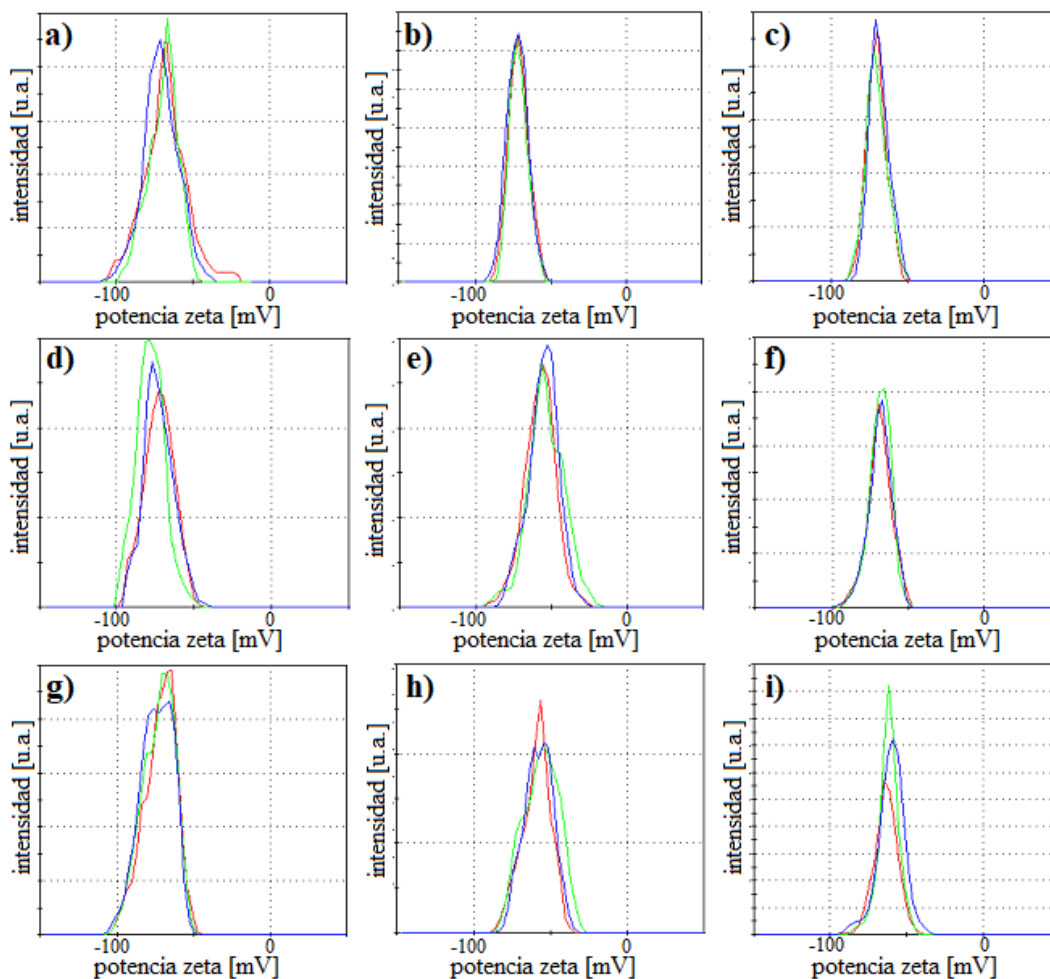


Figura 3.38: Distribuciones estadísticas del potencial zeta de las Co@MnMNPs con los siguientes tamaños de núcleo - espesor coraza: a) 5.23 nm-1.88 nm, b) 5.23 nm-3.63 nm, c) 7.50 nm-1.49 nm, d) 7.50 nm-3.53 nm, e) 7.50 nm-5.11nm, f) 7.50 nm-6.50 nm, g) 13.42 nm-1.75 nm; h) estructura núcleo-coraza NPs1, i) estructura núcleo-coraza NPs 2.

Tabla 3.18: Valores promedio del potencial zeta en los diferentes nanosistemas núcleo-coraza.

FASE ORGÁNICA			FASE ACUOSA	
Diámetro núcleo [nm]	Espesor coraza [nm]	Tamaño MNPs [nm]	Potencial zeta [mV]	Composición ICP-MS Coraza
5.23	1.88	8.98 ± 0.69	-68 ± 13	$\text{Mn}_{0.49}\text{Fe}_{2.51}\text{O}_4$
	3.63	12.49 ± 0.82	-72.0 ± 6.4	$\text{Mn}_{0.35}\text{Fe}_{2.65}\text{O}_4$
7.50	1.49	10.48 ± 0.68	-69.8 ± 7.0	$\text{Mn}_{0.59}\text{Fe}_{2.41}\text{O}_4$
	3.53	14.46 ± 0.91	-74.3 ± 9.4	$\text{Mn}_{0.40}\text{Fe}_{2.60}\text{O}_4$
	5.11	17.7 ± 1.2	-56 ± 11	$\text{Mn}_{0.42}\text{Fe}_{2.58}\text{O}_4$
	6.50	20.5 ± 1.2	-68.9 ± 7.7	$\text{Mn}_{0.77}\text{Fe}_{2.23}\text{O}_4$
13.42	1.75	16.9 ± 1.0	-73 ± 10	$\text{Mn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$
7.50	3.49	14.48 ± 0.95	-58 ± 10	$\text{Mn}_{0.45}\text{Fe}_{2.55}\text{O}_4$
8.48	3.14	14.76 ± 0.80	-65.0 ± 9.8	$\text{Zn}_{0.29}\text{Co}_{0.32}\text{Mn}_{0.18}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$

3.2.5. Caracterización magnética de las MNPs obtenidas

Hasta el momento, en este capítulo se ha explicado cómo se han llevado a cabo las síntesis de una serie de sistemas magnéticos que se pueden dividir en dos grandes grupos: por una parte, sistemas de MNPs homogéneas en su composición, de ca. 8-9 nm de diámetro y con diferentes dopajes simples, dobles y triples de manganeso, cobalto y zinc y, por otra parte, sistemas de MNPs con estructura núcleo-coraza de diferentes composiciones y tamaños de cada una de las partes constituyentes de su estructura dual. Todos estos nanosistemas fueron caracterizados a través de TEM y XRD y, una vez transferidos a medio acuoso mediante un recubrimiento polimérico, se evaluó la conservación de sus características morfológicas y de tamaño así como su estabilidad coloidal.

Una vez comprobado que los sistemas se pueden dispersar en medio acuoso sin perder la morfología y el grado de monodispersidad que exhibían en medio orgánico tras los procesos sintéticos, la siguiente etapa consiste en llevar a cabo su caracterización magnética. Para ello, haciendo uso de un magnetómetro SQUID, se efectuaron medidas de la magnetización de los sistemas a diferentes campos magnéticos aplicados, a temperaturas de 10 K y de 300 K con el fin de obtener los ciclos de

histéresis magnética característicos de cada uno de ellos. Asimismo, también se midieron las curvas de enfriamiento en ausencia y presencia de campo magnético (ZFC y FC), estas últimas bajo un campo magnético aplicado de 0.1 T. A este respecto, a medida que se realizaron las medidas experimentales nos percatamos de que algunos de los sistemas de partículas no resultaban particularmente interesantes por las características magnéticas obtenidas, como es el caso, por ejemplo, de las MNPs de 8-9 nm con dopajes simples con manganeso, que apenas presentan variaciones en sus ciclos de histéresis con respecto a las MNPs de magnetita puras. Por ello, en algunos de los nanosistemas sintetizados en apartados anteriores no se llevaron a cabo las medidas de magnetización frente a campo magnético aplicado. Todos los valores de magnetización medidos en las distintas MNPs fueron normalizados en base a la masa total de metales (hierro, cobalto, zinc y manganeso) presentes en la muestra, previamente determinada mediante ICP-MS.

Para obtener los ciclos de histéresis magnética se midieron los valores de magnetización de los diferentes tipos de partículas frente al campo magnético aplicado, variando este último según se indicó en la Tabla 3.2. Nótese que se comienza obteniendo la magnetización a un campo magnético máximo para luego decrecer progresivamente el valor de este antes de volver de nuevo al citado valor máximo, cerrando de esta forma el ciclo de histéresis. Se obtienen una mayor cantidad de puntos experimentales a valores de campo magnético muy bajo, donde pequeñas variaciones en esta magnitud implican fuertes cambios en los valores de magnetización para, de esta forma, determinar con precisión máxima las características del ciclo de histéresis. Por otra parte, los valores extremos del campo magnético aplicado (aproximadamente 7 T en uno y otro sentido) son, en principio, lo suficientemente elevados para que las MNPs entren en régimen saturado y, así, poder obtener las magnetizaciones de saturación a las diferentes temperaturas.

3.2.5.1. Ciclos de histéresis y curvas FC-ZFC de las MNPs de forma esférica

En primer lugar se midieron las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado de las diferentes MNPs de morfología esférica con un tamaño aproximado de 8-9 nm y modificadas con diferentes dopajes simples, dobles y triples con manganeso, cobalto y zinc, cuya síntesis, funcionalización y caracterización

estructural fue explicada en detalle en apartados previos. Dichas curvas se obtuvieron a dos temperaturas diferentes, 10 K y 300 K, a fin de comprobar el efecto de esta magnitud sobre los ciclos de histéresis magnética de los sistemas nanoestructurados (Figuras 3.39 y 3.40)

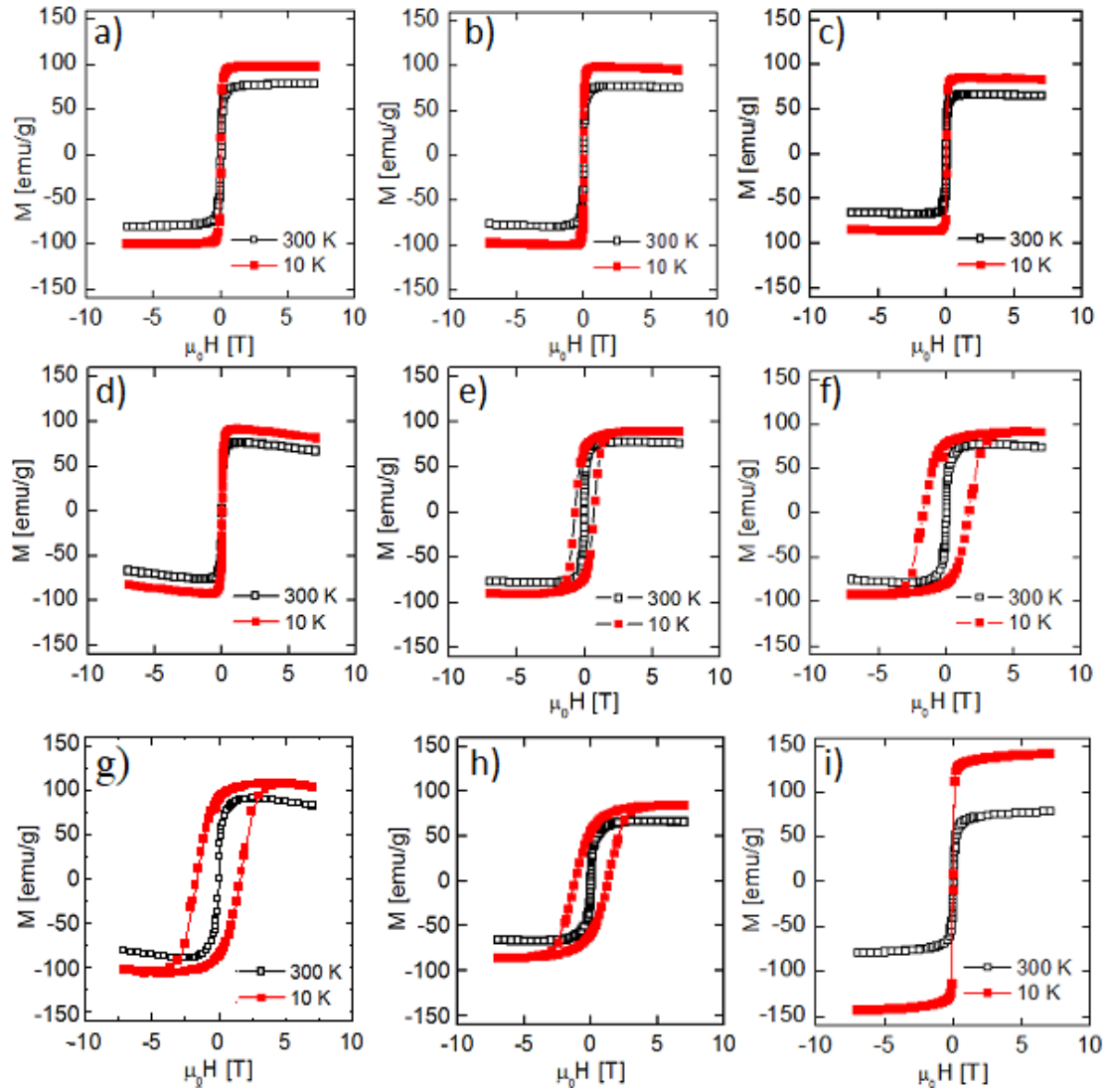


Figura 3.39: Ciclos de histéresis magnética a las temperaturas de 10 K y a 300 K de las MNPs con composiciones determinadas mediante medidas de ICP-MS de: a) Fe_3O_4 , b) $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, c) $\text{Mn}_{0.69}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$, d) $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, e) $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, f) $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, g) $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$, h) $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$, e i) $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$.

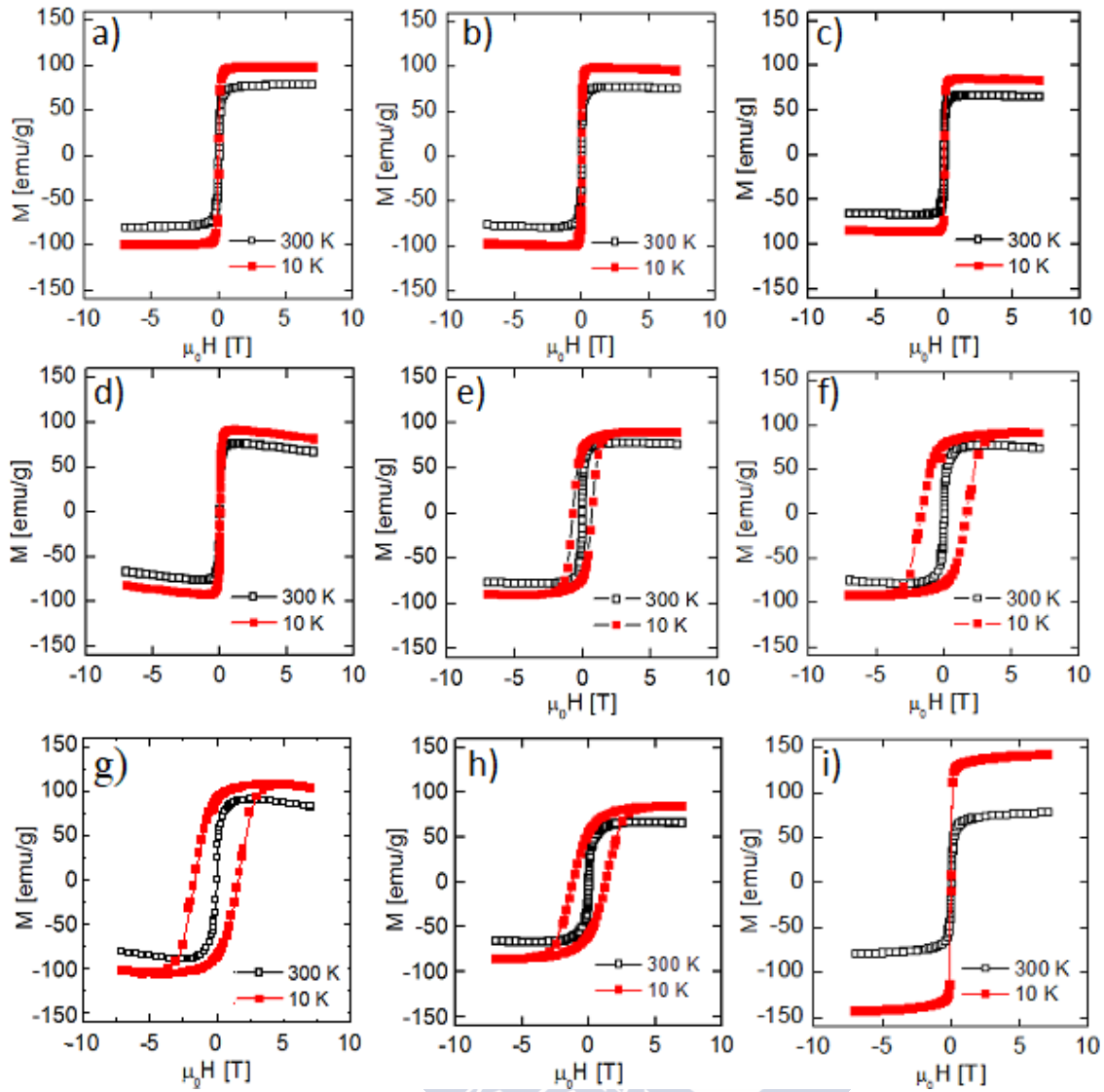


Figura 3.40: Ciclos de histéresis magnética a las temperaturas de 10 K y a 300 K de las MNPs con composiciones determinadas mediante medidas de ICP-MS de: a) $\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, b) $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$, c) $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, d) $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, e) $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, f) $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$, g) $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$, h) $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$, e i) $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$.

Para obtener las curvas FC y ZFC de las MNPs sintetizadas, en primer lugar las muestras se enfrían en ausencia de campo magnético, desde 300 K hasta 10 K, tomando valores de la magnetización en intervalos de temperatura de 10 K, obteniéndose de esta forma la curva ZFC. Posteriormente, se aplica un campo magnético de 0.1 T y se calientan las muestras de nuevo a temperatura ambiente. Manteniendo el campo magnético aplicado se vuelven a enfriar las muestras hasta 10 K, registrando los valores

de magnetización nuevamente en intervalos de temperatura de 10 K y obteniendo, de esta forma, la curva FC. En las Figuras 3.41 y 3.42 se muestran, de forma simultánea, las curvas FC y ZFC características de cada uno de los diferentes sistemas de MNPs estudiados.

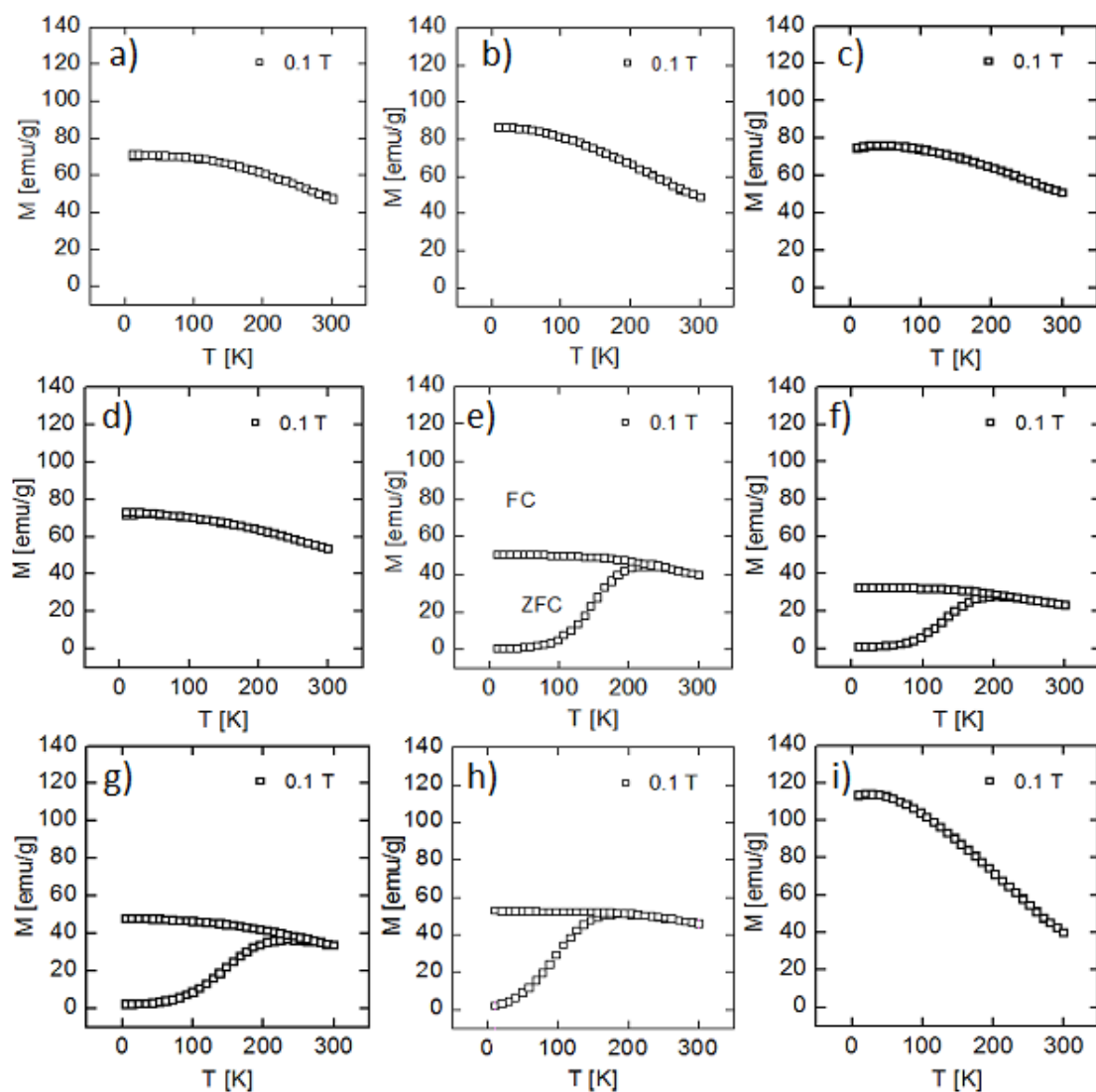


Figura 3.41: Curvas FC y ZFC de las MNPs con composiciones determinadas mediante medidas de ICP-MS de: a) Fe_3O_4 , b) $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, c) $\text{Mn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$, d) $\text{Mn}_{0.95}\text{Fe}_{2.05}\text{O}_4$, e) $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, f) $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, g) $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$, h) $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$, e i) $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$.

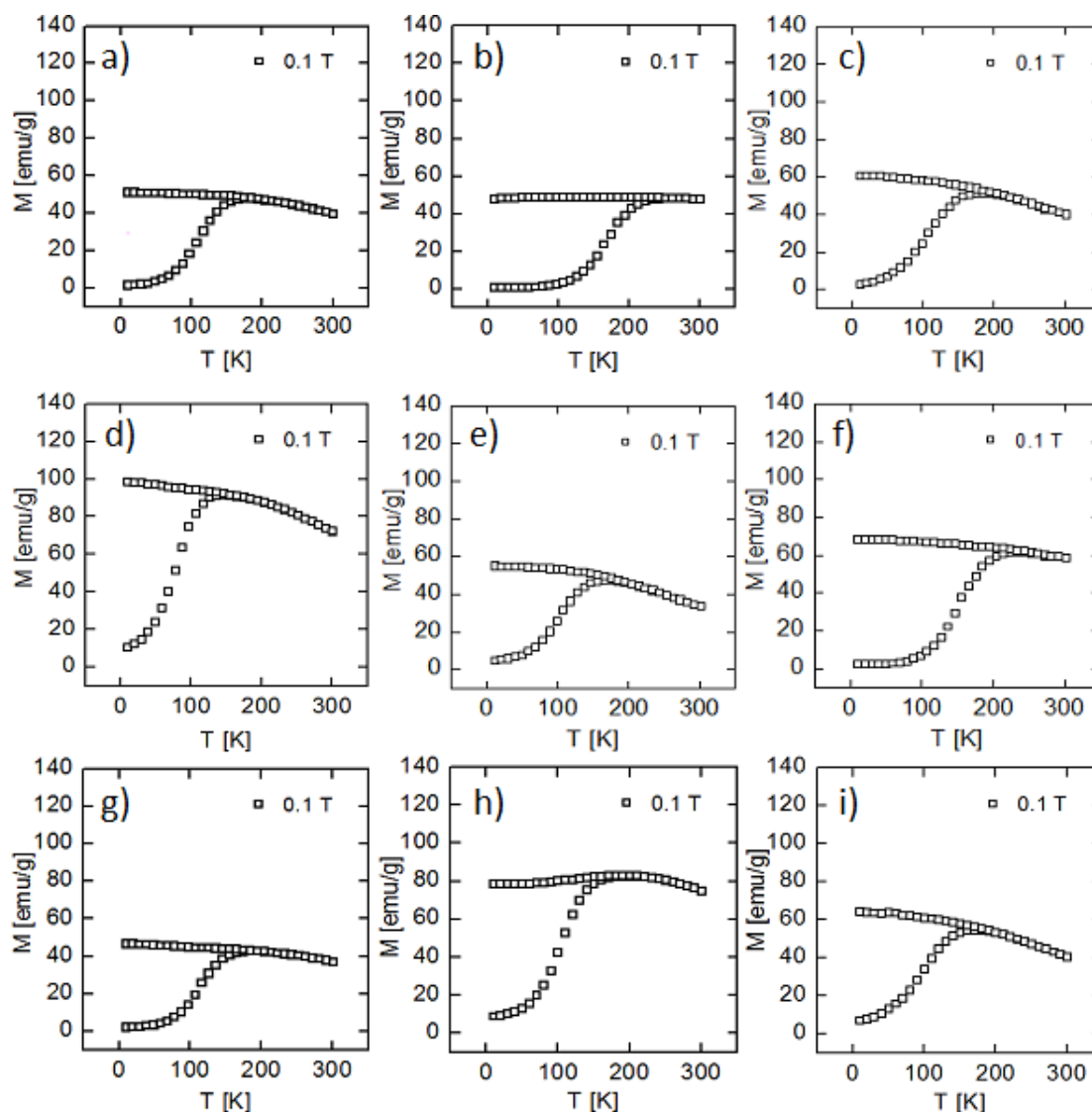


Figura 3.42: Curvas FC y ZFC de las MNPs con composiciones determinadas mediante medidas de ICP-MS de: a) $\text{Co}_{0.28}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, b) $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$, c) $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Fe}_{2.26}\text{O}_4$, d) $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$, e) $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, f) $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$, g) $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$, h) $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$, e i) $\text{Zn}_{0.23}\text{Co}_{0.56}\text{Mn}_{0.08}\text{Fe}_{2.13}\text{O}_4$.

Las magnitudes fundamentales que podemos obtener de los ciclos de histéresis de los distintos sistemas de MNPs, representados en las Figuras 3.39 y 3.40, son las magnetizaciones de saturación, los campos magnéticos coercitivos y las magnetizaciones remanentes a las dos temperaturas estudiadas, si bien son las dos primeras son las que suelen usar como las dos magnitudes más representativas de los ciclos de histéresis magnéticos. Los valores de estas magnitudes determinan el área del ciclo de histéresis, la que a su vez ofrece una primera idea aproximada de la potencial

capacidad de los nanosistemas estudiados como agentes de hipertermia magnética. En la Tabla 3.19 se muestran los valores de estas magnitudes en las diferentes MNPs estudiadas.

Tabla 3.19: Valores de las magnetizaciones de saturación a 10 K y a 300 K y de los campos coercitivos a 10 K de los diferentes sistemas de MNPs dopadas de tamaño 8-9 nm.

Composición ICP-MS	M_S (10 K) [emu/g]	M_S (300 K) [emu/g]	H_C (10 K) [Oe]
Fe ₃ O ₄	91	75	206
Mn _{0.48} Fe _{2.52} O ₄	90	76	213
Mn _{0.69} Fe _{2.31} O ₄	90	78	89
Mn _{0.95} Fe _{2.05} O ₄	86	68	228
Co _{0.12} Fe _{2.88} O ₄	88	75	6997
Co _{0.55} Fe _{2.45} O ₄	91	77	16690
Co _{0.79} Fe _{2.21} O ₄	102	84	17662
Co _{1.07} Fe _{1.93} O ₄	93	73	12851
Zn _{0.63} Fe _{2.37} O ₄	144	78	73
Co _{0.28} Mn _{0.27} Fe _{2.45} O ₄	105	85	10611
Co _{0.29} Mn _{0.93} Fe _{1.78} O ₄	87	75	10505
Zn _{0.12} Mn _{0.26} Fe _{2.62} O ₄	125	93	119
Zn _{0.15} Mn _{0.55} Fe _{2.30} O ₄	113	82	108
Zn _{0.17} Co _{0.57} Fe _{2.26} O ₄	118	87	7132
Zn _{0.32} Co _{0.26} Fe _{2.42} O ₄	161	109	3880
Zn _{0.12} Co _{0.57} Mn _{0.21} Fe _{2.10} O ₄	109	83	9593
Zn _{0.25} Co _{0.29} Mn _{0.21} Fe _{2.25} O ₄	125	98	6508
Zn _{0.23} Co _{0.56} Mn _{0.08} Fe _{2.13} O ₄	130	90	6684
Zn _{0.14} Co _{0.50} Mn _{0.27} Fe _{2.09} O ₄	129	99	9125
Zn _{0.21} Co _{0.34} Mn _{0.24} Fe _{2.21} O ₄	103	72	5488

Como se puede observar en las Figuras 3.39 y 3.40, todos los sistemas estudiados presentan áreas del ciclo de histéresis despreciables en las curvas de

magnetización frente a campo magnético aplicado a temperatura ambiente (300 K). Dado el reducido tamaño de las MNPs, que en ningún caso presentan un diámetro superior a 9.5 nm, el comportamiento de estas es superparamagnético a temperaturas elevadas³¹. Como ya se ha explicado en el capítulo introductorio, el tamaño por debajo del cual las MNPs entran en el régimen superparamagnético, si bien depende de factores como la morfología, la composición o la pureza de las mismas, suele encontrarse en el orden de unas pocas decenas de nanómetros. Es, por ello, que todos los sistemas estudiados se encuentran en este régimen y que a 300 K, debido a que la energía térmica toma un mayor peso que la energía de anisotropía, los momentos magnéticos fluctúan libremente dando lugar a unas curvas de magnetización frente a campo magnético que presentan unos ciclos de histéresis con áreas despreciables^{32,33}. Este comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente se confirma al observar las curvas FC y ZFC de los nanosistemas (Figuras 3.41 y 3.42). La intersección de estas dos curvas, recordemos, tiene lugar a una temperatura crítica, llamada temperatura de bloqueo, por encima de la cual se manifiesta el superparamagnetismo³⁴. En todos los sistemas estudiados esta temperatura de bloqueo está notablemente por debajo de los 300 K, por lo que es lógico que las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado obtenidas a esta temperatura muestren ciclos de histéresis de área prácticamente nula.

Como ya fue explicado en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, la generación de calor por parte de MNPs en régimen superparamagnético, al no presentar estas áreas relevantes en los ciclos de histéresis, es debida a los mecanismos de relajación de Néel y de Brown³⁵ bajo campos magnéticos alternos aplicados³⁶. Sin embargo, la determinación del área de los ciclos de histéresis de las MNPs en régimen bloqueado (por debajo de la temperatura de bloqueo), si bien no guarda una relación directa con la capacidad hipotérmica de las MNPs en régimen superparamagnético (por encima de la temperatura de bloqueo), sí puede ser utilizada como una idea cualitativa de la capacidad de generación de calor de los sistemas magnéticos.

Dado que las MNPs de magnetita han sido ampliamente estudiadas en la literatura, podemos emplear los valores de las magnitudes magnéticas características de nuestro sistema de MNPs sin dopaje como referencia y, a partir de las mismas, estudiar el efecto de los diferentes elementos dopantes en las propiedades magnéticas. Así, en estudios previos se han obtenido valores de magnetización de saturación en un rango bastante amplio para MNPs superparamagnéticas de magnetita, dependiendo

fundamentalmente de su morfología y tamaño, pero también de otros importantes factores como su grado de monodispersidad o el recubrimiento de su superficie^{37,38}. En general, para MNPs esféricas de aproximadamente 8-9 nm las magnetizaciones de saturación suelen oscilar entre 65 y 85 emu/g a 300 K, y entre 75 y 100 emu/g a 10 K, dependiendo de los factores antes mencionados. Los valores de las magnetizaciones de saturación a 10 K y a 300 K medidas en nuestro sistema de MNPs de Fe₃O₄ (Figura 3.39a) fueron 91 y 75 emu/g, respectivamente, por lo que están dentro del rango de valores que se esperaba. Por su parte, el campo magnético coercitivo a muy baja temperatura de este tipo de MNPs en estudios previos presentaba un valor muy bajo, siempre inferior a 0.05 T, lo cual también es congruente con nuestras medidas.

3.2.5.2. Efecto del dopaje sobre las propiedades magnéticas de las MNPs de forma esférica

La sustitución parcial del hierro por los tres elementos dopantes en la estructura de los sistemas da lugar a diferentes efectos en lo que a sus características magnéticas se refiere. Así, en las MNPs con dopaje simple con manganeso se observa que los valores de magnetización de saturación y de campo coercitivo (Figuras 3.39b-d) apenas sufren variaciones con respecto a los obtenidos en el sistema de MNPs sin dopaje. Todos los sistemas de este tipo presentan un área del ciclo de histéresis prácticamente nula a 10 K, y las magnetizaciones de saturación tienden a disminuir, aunque solo de forma muy sutil, con respecto a los valores de la muestra sin dopaje. Por su parte, al introducir cobalto como único elemento dopante se produce una fuerte variación en los valores de los campos magnéticos coercitivos medidos a 10 K. En las MNPs con estequiometría Co_{0.12}Fe_{2.88}O₄ este campo coercitivo pasa de un valor prácticamente nulo a un valor aproximado de 0.7 T (Figura 3.39e). Al incrementar la presencia de cobalto de forma que la composición de las MNPs sea Co_{0.55}Fe_{2.45}O₄ y Co_{0.79}Fe_{2.21}O₄ el campo coercitivo alcanza valores de 1.7 y 1.8 T, respectivamente (Figuras 3.39f-g), y solo en el grado de sustitución de cobalto más elevado, en las MNPs de composición Co_{1.07}Fe_{1.93}O₄, se rompe esta tendencia creciente puesto que su campo coercitivo a 10 K es de 1.3 T (Figura 3.39h). Este comportamiento puede ser debido a que estas últimas MNPs presentan un tamaño ligeramente inferior al de las demás partículas (aproximadamente 7.20 nm), con lo que sus características magnéticas también se ven levemente

modificadas. En lo que a los valores de las magnetizaciones de saturación se refiere, la introducción de cobalto como dopante individual, al igual que sucedía con el manganeso, no conlleva importantes modificaciones en los valores de dicha magnitud.

Por último, el ensayo con un dopaje individual con zinc muestra que la presencia de este elemento da lugar a un muy importante crecimiento en la magnetización de saturación a 10 K, no variando en este caso de forma clara tanto la magnetización de saturación a temperatura ambiente como el campo coercitivo a 10 K. Las MNPs con composición $\text{Zn}_{0.63}\text{Fe}_{2.37}\text{O}_4$ muestran una magnetización de saturación a 10 K de 144 emu/g (Figura 3.39i), muy superior a los 91 emu/g que se midieron en las MNPs de magnetita, mientras que a 300 K el incremento de esta magnitud es menos relevante. Por su parte, el campo coercitivo a baja temperatura sigue presentando un valor muy reducido.

Por su parte, en los sistemas con dopajes múltiples, como regla general, se mezclan los efectos antes descritos en función de los distintos elementos que estén presentes en la estructura de las MNPs. Así, por ejemplo, se puede observar que todas las MNPs que incluyen cobalto entre sus elementos dopantes presentan un campo coercitivo importante a la temperatura de 10 K, o que la práctica totalidad de los sistemas con presencia de zinc muestran magnetizaciones de saturación a baja temperatura notablemente superiores a la del sistema de MNPs de magnetita pura no dopada. En las Figuras 3.43 y 3.44 se muestran la variación de los distintos parámetros magnéticos obtenidos a partir de las curvas de histéresis de los sistemas en función de la presencia de los distintos elementos dopantes. En estas representaciones se excluyeron los datos correspondientes a las muestras con composición $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$, $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$ ya que, si bien los valores de las magnitudes magnéticas no eran en todos los casos incongruentes con el resto de las medidas realizadas, se trata de sistemas cuyas MNPs constituyentes presentan un tamaño notablemente inferior a los 8-9 nm del resto de las muestras, por lo que consideramos que esta diferencia en las dimensiones podría ser clave en los valores obtenidos de los ciclos de histéresis magnética y las diferencias observadas.

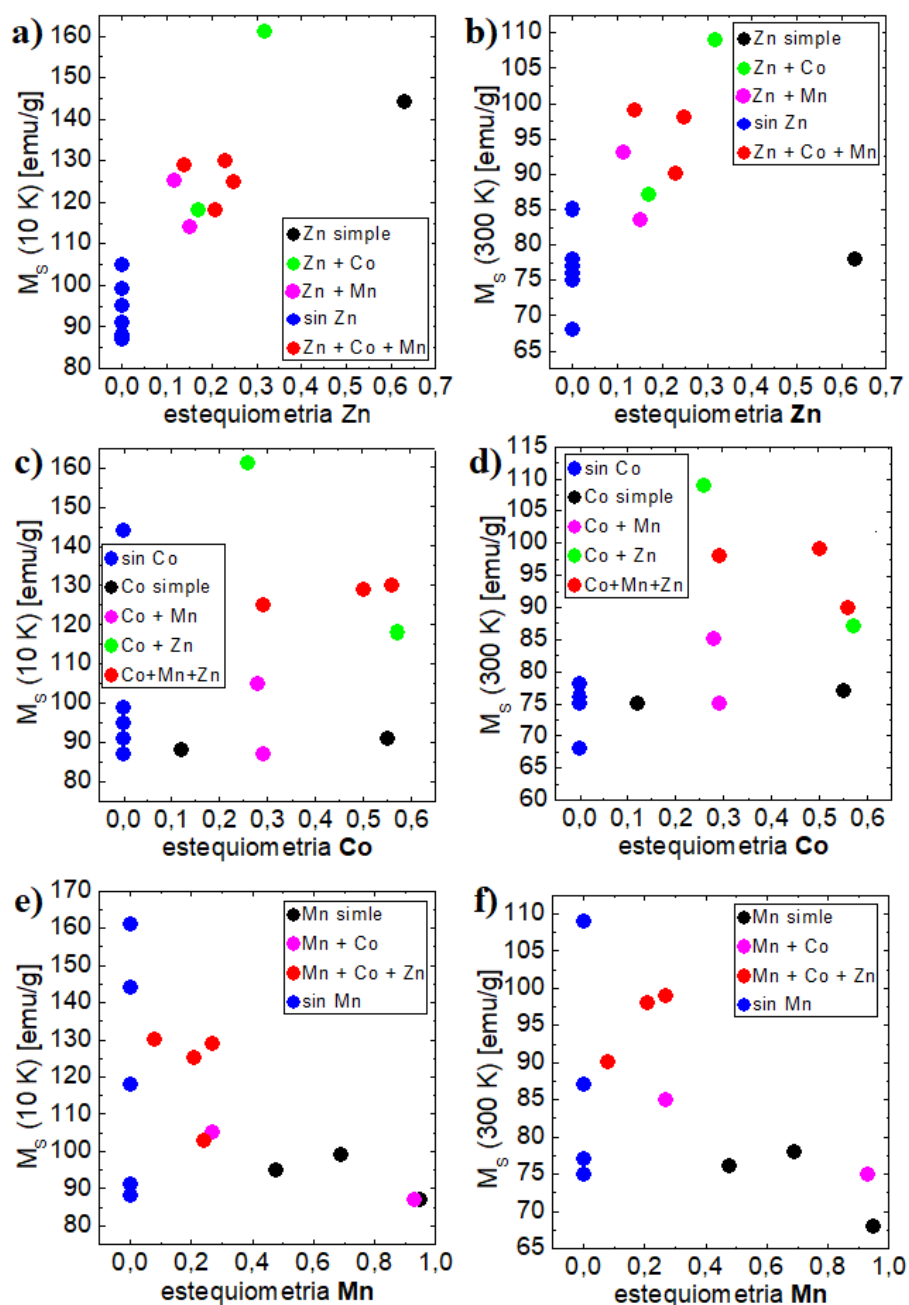


Figura 3.43: Representaciones gráficas de las magnetizaciones de saturación frente a las estequiometrías de a) Zn a 10 K, b) Zn a 300 K, c) Co a 10 K, d) Co a 300 K, e) Mn a 10 K y f) Mn a 300 K. Incertidumbre estimada máxima $\pm 8\%$.

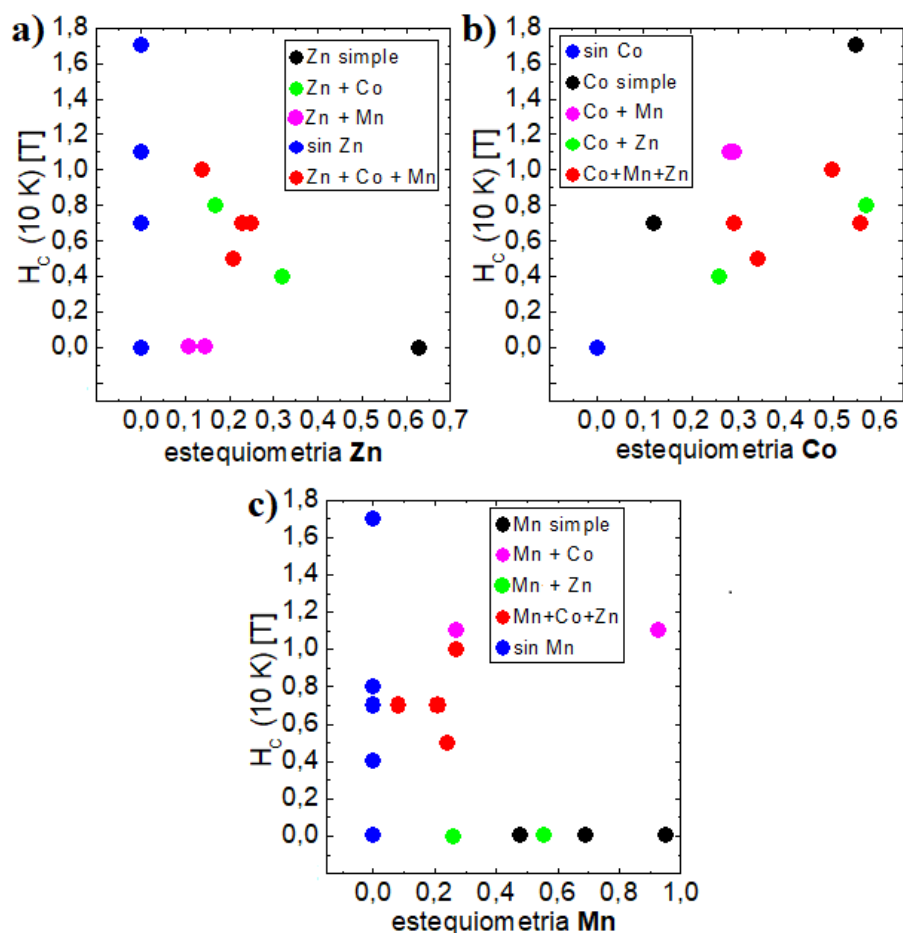


Figura 3.44: Representaciones gráficas de los campos magnéticos coercitivos a 10 K frente a las estequiometrías de a) Zn, b) Co y c) Mn. Incertidumbre estimada máxima $\pm 10\%$.

En las Figuras 3.43a-b se puede observar de forma clara la tendencia antes referida del incremento de las magnetizaciones de saturación a 10 K y a 300 K al aumentar la cantidad de zinc en la estructura de los nanosistemas. Sin embargo, no se trata de un aumento continuo, dado que las curvas semejan mostrar un valor máximo de las saturaciones a las dos temperaturas estudiadas cuando la estequiometría de zinc se encuentra en el intervalo 0.30-0.50, comenzando a decaer a grados de dopaje más elevados. En este sentido, las magnetizaciones de saturación más elevadas dentro del conjunto de muestras sintetizado se correspondieron al sistema con una estequiometría de zinc de 0.32, alcanzando dichas magnitudes valores máximos de 161 y 109 emu/g a 10 K y a 300 K, respectivamente. La muestra con una estequiometría en zinc de 0.63 muestra unos valores de saturación sensiblemente inferiores, pero la ausencia de MNPs sintetizadas con estequiometrías entre las dos citadas anteriormente no permite

determinar con exactitud el grado de dopaje al que se obtiene el valor máximo de saturación, si bien, como se mencionó con anterioridad, se puede estimar en el intervalo 0.30-0.50. Asimismo, la sola existencia de una sola muestra con un dopaje simple con zinc no permite analizar de forma más exhaustiva las influencias separadas de la estequiometría de zinc y de su combinación con los demás elementos dopantes ensayados.

En las Figuras 3.43c-d se representan las magnetizaciones de saturación a 10 y a 300 K frente a la cantidad de cobalto, no observándose en las mismas ninguna tendencia clara. De hecho, en estas gráficas los distintos puntos experimentales parecen estar agrupados en función de los elementos dopantes presentes en las muestras (representados por cada color) además del elemento frente al que se representan las magnetizaciones de saturación. Esto significa, por tanto, que el cobalto no tiene un importante peso específico a nivel individual en los valores de magnetización de saturación de los sistemas, siendo la presencia o ausencia de otros elementos (zinc y manganeso) la que determina en gran medida estas magnitudes.

Por último, en las Figuras 3.43e-f se puede observar la tendencia decreciente de las magnetizaciones de saturación a las dos temperaturas estudiadas a medida que se aumenta la cantidad de manganeso en las MNPs, si bien nuevamente parece existir una importante influencia de los demás elementos dopantes. Este comportamiento es, no obstante, menos claro que el incremento observado al modificar la cantidad de zinc, variando además los valores de las saturaciones en un intervalo más reducido. Por tanto, son los dopajes con zinc los que influyen más claramente en los valores de las magnetizaciones de saturación, siendo la presencia de manganeso y, especialmente, cobalto, menos importantes en este sentido.

Los comportamientos observados son, en cierta medida, los cualitativamente esperados al introducir estos tres elementos dopantes en la red cristalina de las MNPs^{20,39}. La estructura de espinela de las MNPs de magnetita, recordemos, consiste en una disposición de cationes Fe^{2+} y Fe^{3+} con ordenamiento ferrimagnético y situados en posiciones cristalográficas que pueden ser de dos tipos según su coordinación con los átomos de oxígeno: tetraédricas u octaédricas¹⁹. La celda unidad tiene un total de 8 átomos de hierro en posiciones tetraédricas y 16 en posiciones octaédricas, de modo que la estructura de la magnetita puede escribirse de la forma $(\text{Fe}^{3+})^{\text{tet}}(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+})^{\text{oct}}\text{O}_4$.

Los momentos magnéticos de los cationes de Fe^{3+} en posiciones tetraédricas y octaédricas se cancelan, siendo la magnetización de las MNPs debida únicamente a los cationes Fe^{2+} situados en posiciones octaédricas⁴⁰.

Debido a esto, los dopajes con elementos como el cobalto, cuyos cationes se sitúan en posiciones octaédricas, no producen grandes variaciones en las magnetizaciones de saturación, dado que la cancelación del efecto de los momentos de los cationes Fe^{3+} se mantiene, siendo el momento magnético neto debido exclusivamente a los cationes ubicados en posiciones octaédricas (Fe^{2+} y Co^{2+}). Sería esperable una ligera disminución en las saturaciones a medida que se incrementa el grado de dopaje con cobalto, dado que el momento magnético de los átomos de dicho elemento dopante es ligeramente inferior al de los átomos Fe^{2+} (1.7 frente a 2.2 magnetones de Bohr)⁴¹. Sin embargo, este fenómeno no se observa de forma clara en las ferritas sintetizadas, no influyendo la presencia de cobalto de forma relevante sobre las saturaciones en los distintos tipos de dopaje ensayados. Esto es debido a la sutil diferencia entre los momentos de hierro y cobalto, de forma que el efecto de estos últimos puede ser compensado por pequeñas variaciones en la pureza y cristalinidad de las muestras. En el Capítulo anterior, en el que se estudió la influencia de los dopajes con cobalto sobre las características magnéticas de nanocubos de 30 y 40 nm, sí se observó un ligero decrecimiento de las saturaciones con el grado de dopaje, si bien ese fenómeno estaba en parte asociado a la pérdida de morfología cúbica de las MNPs cuando la presencia de cobalto era muy elevada, cosa que no sucede en el presente caso. Estudios previos^{42,43} han mostrado también que los dopajes con cobalto suelen dar lugar a pequeños descensos en las magnetizaciones de saturación, si bien estos no son muy importantes, por tanto, corroborándose la pequeña influencia de este dopante sobre la magnitud en cuestión, de acuerdo a los resultados obtenidos.

Por otra parte, el efecto de los dopajes con zinc sobre las magnetizaciones de saturación de las MNPs puede provenir de la disposición de estos átomos metálicos en las posiciones tetraédricas de la estructura de espinela de las ferritas, generando una estructura de espinela normal. De esta forma, la presencia de este elemento dopante rompe la cancelación total entre los momentos de los cationes Fe^{3+} situados en posiciones tetraédricas y octaédricas; es decir, al sustituir parte del Fe^{3+} tetraédrico por zinc, la parte equivalente del Fe^{3+} octaédrico deja de sufrir el efecto de cancelación de su momento magnético. Esto se traduce en una contribución positiva a la magnetización

de las MNPs, la cual da lugar a un incremento de las magnetizaciones de saturación a medida que se incrementa la cantidad de zinc presente. Debido a este fenómeno, en las partículas dopadas con zinc sintetizadas previamente se llegaron a medir magnetizaciones de saturación a 10 K y a 300 K de 161 y 109 emu/g, respectivamente, valores muy superiores a los 91 y 75 emu/g medidos en las MNPs sin dopaje de similares características de tamaño y morfología.

Como se mencionó previamente, el aumento de las magnetizaciones de saturación con el grado de dopaje con zinc no es continuo, sino que estas alcanzan un valor máximo cuando la estequiometría del dopante se encuentra en torno a 0.30-0.50, decayendo a valores superiores. Este mismo comportamiento ya fue observado en el caso de los nanocubos magnéticos sintetizados en el Capítulo anterior, en el cual se estableció un grado de dopaje de aproximadamente 0.30 como aquel que daba lugar a unas saturaciones máximas. Asimismo, estudios previos también han elucidado la existencia de un rango óptimo de dopaje con este elemento metálico. Así, Cheon *et al.*²⁹, por ejemplo, sintetizaron MNPs de distintos tamaños y morfologías con las que establecieron que los valores máximos de saturación se alcanzaban cuando la estequiometría de zinc se situaba en aproximadamente 0.40. Byrne *et al.*⁴⁴ también efectuaron un estudio en el que emplearon MNPs dopadas con zinc, concluyendo que las saturaciones de estas eran máximas de nuevo en estequiometrías próximas a 0.40.

La razón para la existencia de este rango de dopaje óptimo reside, en parte, en el elevado peso atómico de los cationes de zinc, de forma que a grados de dopaje elevados pueden dar lugar a pequeñas roturas de la simetría de coordinación de la estructura cristalina, pudiendo este fenómeno ser lo suficientemente importante como para generar descensos en los valores de las magnetizaciones netas. Sin embargo, el motivo principal se asocia a la posibilidad de que parte del zinc se sitúe en posiciones octaédricas cuando el grado de incorporación de dicho dopante es elevado. De este modo, los cationes de zinc ocupan la posiciones de parte de los cationes Fe^{2+} octaédricos, anulando la contribución fundamental de estos a las magnetizaciones de las MNPs disminuyendo las magnetizaciones de saturación⁴⁵.

Por último, el efecto de los dopajes con manganeso sobre las magnetizaciones de saturación resulta más complicado de analizar, dado que la configuración electrónica de los átomos de dicho elemento permite que estos se sitúen indistintamente en

posiciones tetraédricas u octaédricas⁴⁶. Además, debe tenerse en cuenta que las características magnéticas de los átomos de manganeso son muy similares a las de los átomos de hierro⁴⁷ (magnetización muy similar a la de los átomos de Fe^{3+} y ligeramente superior a la de los átomos Fe^{2+}) lo cual dificulta la determinación del posicionamiento de este dopante en la estructura de espinela en base a las medidas magnéticas efectuadas. Como se explicó anteriormente, la disposición del manganeso en la estructura de espinela parece estar determinada de forma principal por la presencia de otros elementos dopantes (cobalto y zinc), de forma que la presencia de estos también juega un papel muy importante en las características magnéticas de las MNPs. Así, la baja influencia del manganeso sobre las magnetizaciones de saturación cuando este actúa como único elemento dopante parece indicar su disposición en las posiciones tetraédricas de la estructura de espinela. En este caso, al sustituir a átomos Fe^{3+} de características magnéticas muy similares las saturaciones apenas cambian con respecto a las MNPs sin dopaje, manteniéndose en gran parte el efecto de cancelación de los momentos magnéticos de los átomos Fe^{3+} octaédricos y siendo la magnetización neta debida de forma prácticamente íntegra a los cationes Fe^{2+} octaédricos. Al combinarse con los otros dos elementos dopantes, sin embargo, parte del manganeso puede situarse en posiciones octaédricas, sustituyendo en este caso a átomos Fe^{2+} de características ligeramente diferentes y produciendo pequeñas variaciones en las magnetizaciones de saturación de los sistemas. El bajo valor de las magnetizaciones de saturación observado cuando el grado de dopaje con manganeso es muy elevado también puede ser en parte atribuido al elevado tamaño de los átomos de este elemento, ligeramente superior al de los átomos de hierro, el cual puede ocasionar importantes roturas de la simetría de coordinación de las redes cristalinas^{21,48}.

Respecto a los campos coercitivos de las MNPs medidos a 10 K (Figura 3.44), resulta evidente que, de los elementos dopantes ensayados, el cobalto es el que tiene una mayor influencia sobre dicha magnitud. De hecho, en todos y cada uno de las MNPs que no fueron modificadas con cobalto, incluido el de MNPs sin dopar, el campo coercitivo a baja temperatura medido fue prácticamente nulo. En la Figura 3.44b se observa que, como norma general, el campo coercitivo aumenta a medida que se incrementa el grado de dopaje con cobalto, llegando a obtenerse un valor máximo de 1.7 T en las MNPs de composición $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$ (nótese que la muestra de composición $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ se midió un campo coercitivo de 1.8 T, pero esta fue descartada de las

representaciones debido a que su tamaño difería de forma importante del de las otras MNPs). El aumento del campo coercitivo con el grado de dopaje con cobalto es especialmente importante en las muestras con dopajes simples o en las de dopajes dobles con cobalto y manganeso, mientras que es más reducido en las muestras con dopajes con cobalto y zinc y con dopajes triples. Dado que en estos dos últimos tipos está presente el zinc podemos concluir que este elemento tiende a disminuir ligeramente el valor de los campos coercitivos, si bien se trata de un efecto sutil. Este hecho se confirma adicionalmente en la Figura 3.44a, en la que se representan los valores del campo coercitivo frente a la cantidad de zinc en las partículas, y en la que se observa una disminución en las coercitividads a medida que aumenta la cantidad de zinc en las diferentes MNPs. Nótese, además, que la única muestra con dopaje simple con zinc, así como aquellas con dopajes dobles con zinc y manganeso, presentan un campo coercitivo inferior al de las MNPs sin dopar, aunque al tratarse en todos los casos de valores muy bajos las diferencias absolutas son pequeñas. Por ello, se concluye la existencia de una pequeña contribución negativa del zinc sobre la coercitividad, aunque siendo mucho más influyente sobre esta magnitud la presencia o ausencia de cobalto.

Por su parte, en la representación gráfica de los campos coercitivos frente a la cantidad de manganeso en las MNPs (Figura 3.44c) no se observa ninguna tendencia clara, agrupándose los puntos experimentales en función de su color, lo cual es indicativo de que las coercitividads dependen fundamentalmente del resto de elementos presentes en los dopajes, teniendo el manganeso poco peso a nivel individual en los valores de esta magnitud.

El incremento de los campos coercitivos al aumentar el grado de dopaje con cobalto coincide con las observaciones realizada en estudios previos⁴⁹. Asimismo, los resultados obtenidos están en consonancia con los logrados en el estudio del efecto de los dopajes con cobalto en nanocubos magnéticos de 30 y 40 nm de longitud de arista, como puede comprobarse en el Capítulo anterior. El origen del incremento de las coercitividads al incluir cobalto en la estructura de las partículas está, en la disposición de los cationes de dicho elemento dopante en las posiciones octaédricas de la estructura de espinela de las ferritas. En estas posiciones octaédricas, los diferentes átomos constituyentes se encuentran empaquetados de forma muy densa, de modo que al sustituir parte de los cationes de hierro por cationes de cobalto, de tamaño similar pero mayor peso atómico, se produce un incremento de la tensión estructural de la red

cristalina. Esta deriva, a su vez, en un aumento de la anisotropía de las MNPs, el cual da lugar a un aumento de su campo coercitivo.

La influencia de los dopajes con zinc sobre los campos coercitivos, por su parte, es mucho menor,⁵⁰. En las diferentes muestras sintetizadas en el presente capítulo se observa que la sola presencia de zinc disminuye el campo coercitivo de las MNPs a 10 K, si bien al tratarse en todos los casos de valores muy bajos las diferencias son reducidas. También se manifiesta su efecto en las muestras dopadas con zinc y cobalto, con un campo coercitivo elevado, reduciendo de forma muy sutil el efecto de este último sobre el incremento de dicha magnitud. La baja influencia de los dopajes con zinc sobre los campos coercitivos tiene su explicación en la disposición de los átomos de este elemento en las posiciones tetraédricas de la estructura de las ferritas, como se comentó con anterioridad. En estas posiciones, los átomos están empaquetados de forma poco densa, de modo que la sustitución de los átomos de hierro por otros cationes metálicos no tiene una alta influencia sobre la tensión estructural de los sistemas ni, en consecuencia, sobre sus campos coercitivos. La ligera contribución negativa de los dopajes con zinc a las coercitividads medidas puede atribuirse al reducido tamaño de los átomos de este elemento, el cual, a pesar de su alto peso atómico, puede disminuir la tensión estructural de los sistemas.

Por último, la influencia del manganeso sobre los campos coercitivos es muy pequeña, dependiendo esta magnitud fundamentalmente de la presencia de los demás elementos dopantes, como se ha comentado. El manganeso se puede situar indistintamente en las posiciones tetraédricas y octaédricas de la estructura de espinela y, en base a lo comentado previamente en los dopajes con zinc, su disposición en las posiciones tetraédricas no produce apenas efecto sobre los campos coercitivos. Cuando se dispone en posiciones octaédricas, por su parte, su efecto sobre la tensión estructural de las MNPs también es reducido, dado que los cationes de manganeso tienen un tamaño similar a los de hierro y un peso atómico inferior. Es por ello que, salvo que el grado de dopaje fuese muy elevado, en cuyo caso el manganeso podría manifestar una influencia negativa sobre los valores de las coercitividads, su efecto es menor.

Las variaciones de los valores de las propiedades magnéticas según las cantidades de los distintos elementos dopantes en la estructura de los nanosistemas se puede analizar de forma más visual a través de mapas de color (Figuras 3.45 y 3.46). En

estos, los valores que toman dichas magnitudes se representan en forma de diferentes colores frente a las cantidades de dos de los elementos dopantes, simulando los valores que tomarían en todo el espectro deseado. De esta forma, se puede visualizar de manera más directa las estequiometrías combinadas de zinc, cobalto y manganeso que dan lugar a los valores de magnetización de saturación y de coercitividad más elevados.

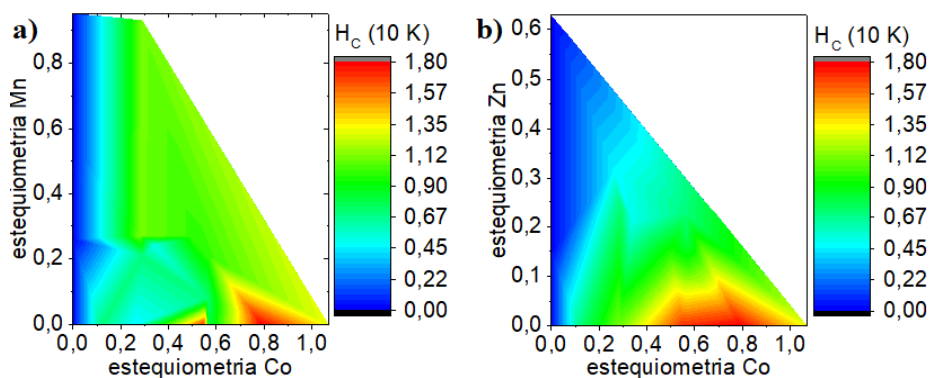


Figura 3.45: Mapas de color del campo coercitivo a 10 K en función de las estequiometrías de a) Co-Mn y b) Co-Zn.

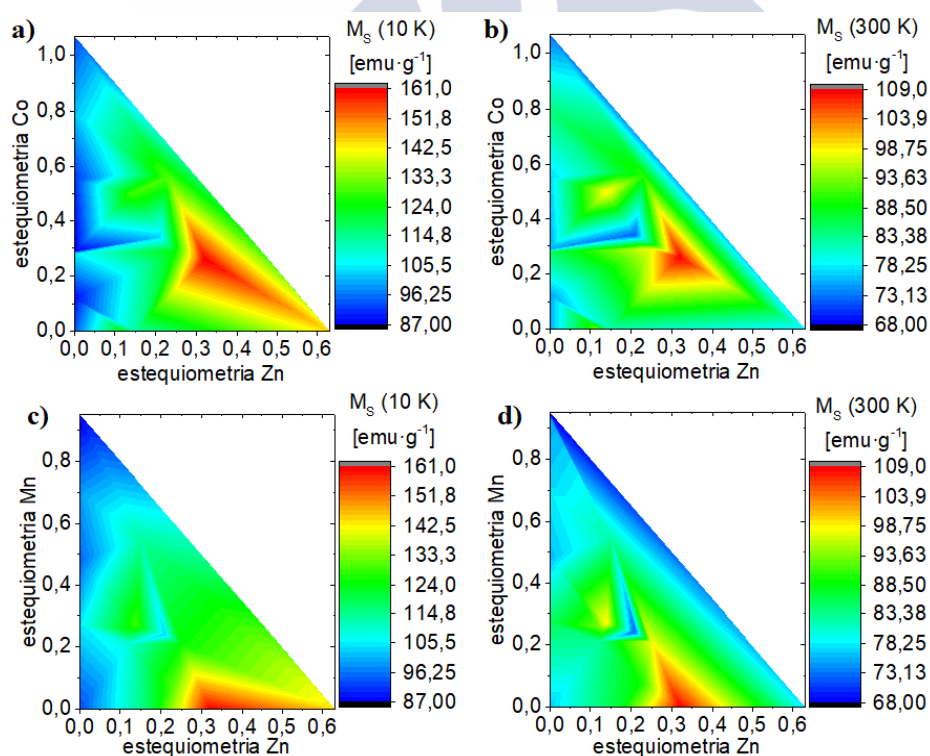


Figura 3.46: Mapas de color de las saturaciones a 10 K en función de las estequiometrías de a) Zn-Co y c) Zn-Mn, y a 300 K en función de las estequiometrías de b) Zn-Co y d) Zn-Mn.

Los mapas de color confirman que el elemento clave para obtener altos campos coercitivos es el cobalto (Figura 3.44). A medida que se incrementa la presencia de este elemento dopante en los sistemas, sus coercitividades a la temperatura de 10 K aumentan, alcanzando valores máximos para estequiometrías de cobalto, dentro del rango obtenido, superiores a ca. 0.50. Por su parte, como también se había concluido previamente, los campos coercitivos no se ven altamente afectados por la presencia de zinc y de manganeso. Sin embargo, los mapas de color muestran que para que los valores de coercitividad sean máximos la presencia de cobalto no puede ser combinada con una presencia elevada de estos dos últimos elementos dopantes. A partir de estequiometrías de aproximadamente 0.20, tanto en uno como en otro caso, los valores de campo coercitivo comienzan a decaer aunque la cantidad de cobalto sea elevada. En lo referente a las magnetizaciones de saturación, por su parte, los mapas de color también refrendan las conclusiones anteriores (Figura 3.45). Así, se consiguen valores máximos de saturación para estequiometrías de zinc en el intervalo aproximado de 0.30-0.50, pudiendo combinarse estas con un amplio rango de dopajes con cobalto. Por otra parte, las estequiometrías de manganeso superiores a aproximadamente 0.20 hacen que las saturaciones comiencen a decrecer de forma significativa.

3.2.5.3. Ciclos de histéresis y curvas FC-ZFC de las MNPs con estructura núcleo-coraza

La caracterización magnética de las diferentes estructuras núcleo-coraza sintetizadas se llevó a cabo de igual forma que la de las ferritas dopadas con cobalto, zinc y manganeso explicada a lo largo del presente Capítulo. Así, se midieron las curvas FC y ZFC, esta última bajo un campo aplicado de 0.1 T, y las curvas de magnetización frente a un campo magnético aplicado a 10 K y a 300 K, respectivamente. Se aplicó de nuevo un campo máximo de 7 T en uno y otro sentido para la obtención de estas últimas medidas, dado que en principio supone un valor lo suficientemente elevado para que los sistemas entren en régimen saturado. Inicialmente se caracterizaron los núcleos de óxido de hierro dopados con cobalto que sirvieron como semilla para el crecimiento de estas estructuras duales para, así, poder observar como variaban sus propiedades al añadir corazas de diferentes espesores (Figura 3.47).

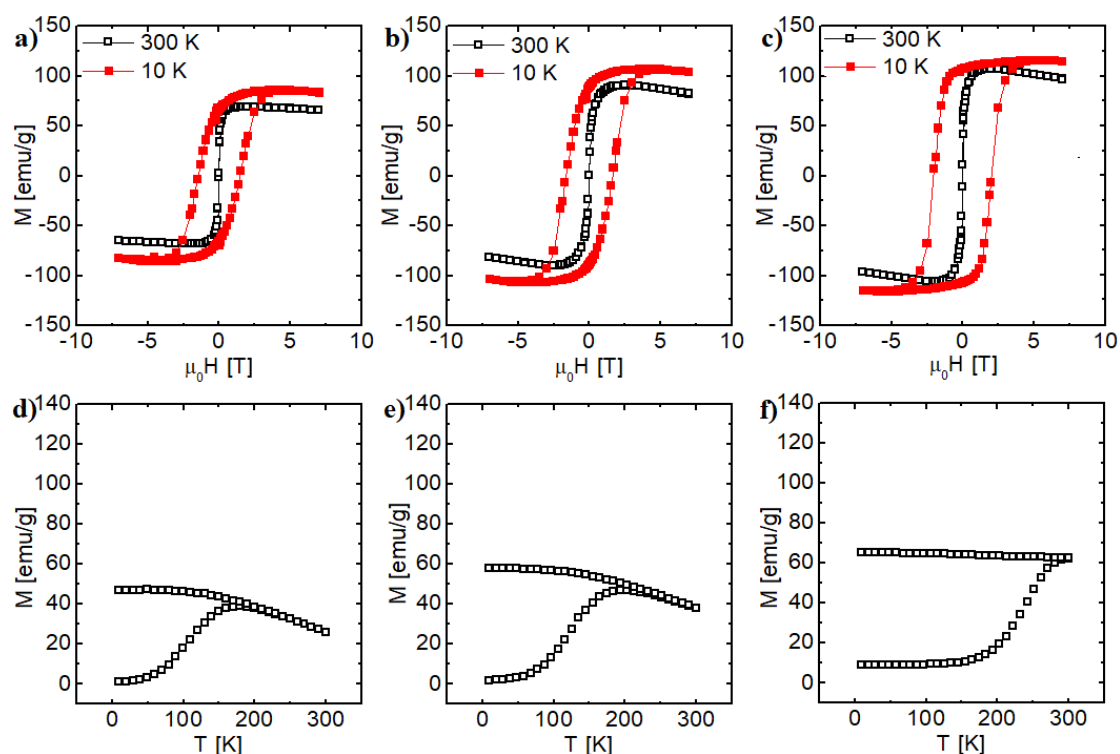


Figura 3.47: Ciclos de histéresis magnética a las temperaturas de 10 K y a 300 K y curvas FC y ZFC de las MNPs de óxido de hierro dopadas con cobalto (núcleos) con un diámetro de: a), d) 5.23 nm, b), e) 7.50 nm y c), f) 13.42 nm.

La caracterización magnética de los núcleos de diferentes tamaños da lugar a los resultados esperados. En primer lugar, los tres sistemas sintetizados muestran una temperatura de bloqueo inferior a 300 K, tal y como se puede concluir a partir de sus curvas FC y ZFC, lo cual implica un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente. Nótese que en el caso de las MNPs de mayor tamaño, las de 13.42 nm de diámetro, la intersección entre las curvas FC y ZFC muestran una temperatura de bloqueo muy próxima a 300 K. Sin embargo, las medidas de magnetización frente al campo magnético aplicado a esa temperatura dan lugar a un ciclo de histéresis de área despreciable, confirmando el comportamiento superparamagnético del sistema. Por su parte, los valores de las magnetizaciones de saturación y de los campos coercitivos a baja temperatura son congruentes en las distintas muestras, aumentando dichas magnitudes a medida que aumenta el tamaño de las MNPs.

En la Figuras 3.48 y 3.49 se muestran las medidas de caracterización magnética efectuadas a los diferentes sistemas con estructura núcleo-coraza que se prepararon tomando como semilla las MNPs de óxido de hierro dopadas con cobalto de diferentes tamaños previamente sintetizadas. En la Tabla 3.20, por su parte, se muestran los valores de las principales magnitudes características de los ciclos de histéresis, esto es, las magnetizaciones de saturación a 300 K y a 10 K el campo coercitivo a esta última temperatura.

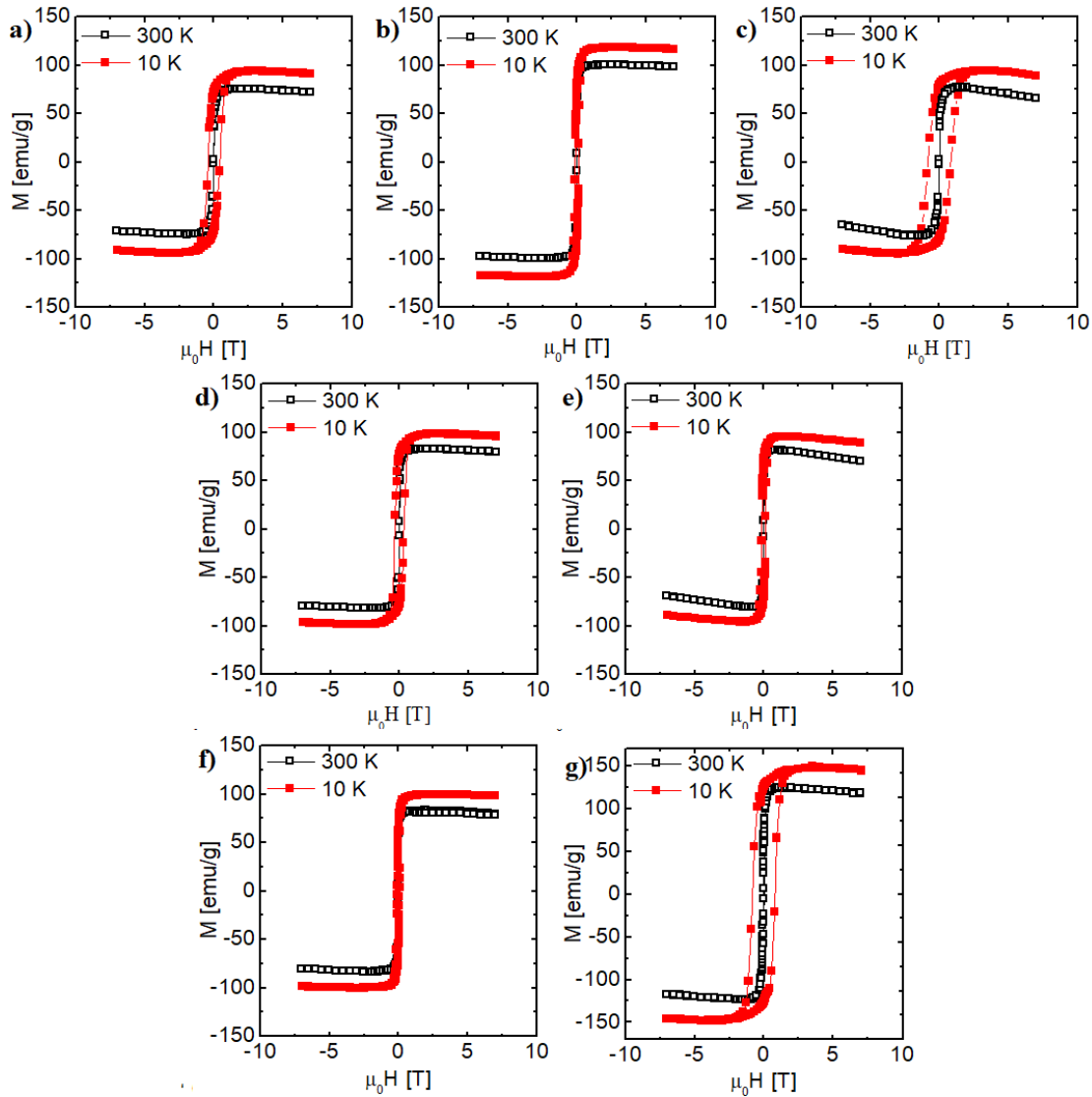


Figura 3.48: Ciclos de histéresis magnética a las temperaturas de 10 K y 300 K de las Co@MnMnPs con diámetro de núcleo - espesor de coraza de: a) 5.23 nm-1.88 nm, b) 5.23 nm-3.63 nm, c) 7.50 nm-1.49 nm, d) 7.50 nm-3.53 nm, e) 7.50 nm-5.11 nm, f) 7.50 nm-6.50 nm y g) 13.42 nm-1.75 nm.

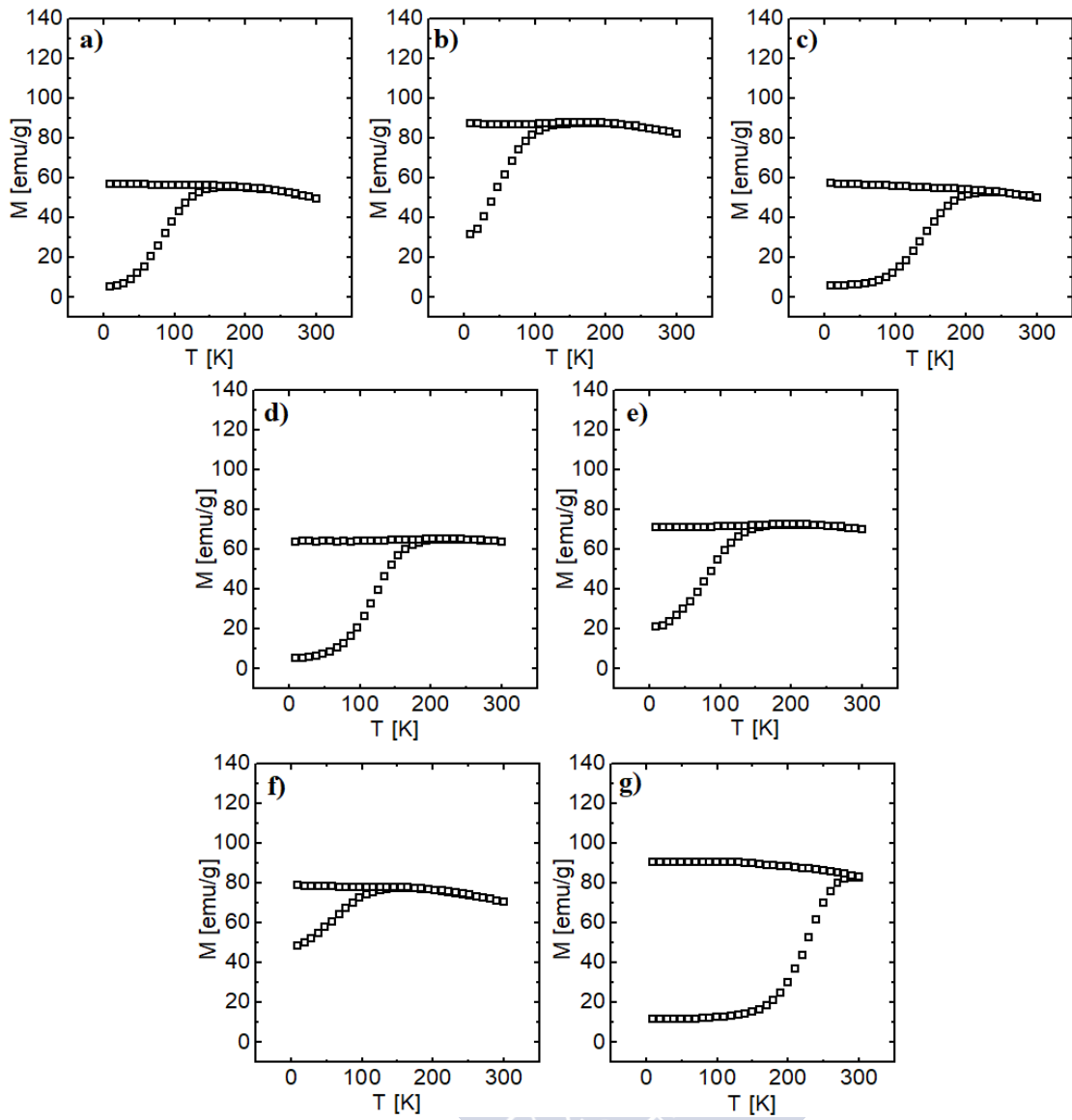


Figura 3.49: Curvas FC y ZFC de las Co@MnMnPs con tamaño de núcleo - espesor de coraza de: a) 5.23 nm-1.88 nm, b) 5.23 nm-3.63 nm, c) 7.50 nm-1.49 nm, d) 7.50 nm-3.53 nm, e) 7.50 nm-5.11 nm, f) 7.50 nm-6.50 nm y g) 13.42 nm-1.75 nm.

Tabla 3.20: Valores de las magnetizaciones de saturación a 10 K y a 300 K, y de los campos coercitivos a 10 K de los diferentes sistemas con estructura núcleo-coraza.

Diámetro núcleo [nm]	Espesor coraza [nm]	M _S (10 K) [emu/g]	M _S (300 K) [emu/g]	H _C (10 K) [Oe]
5.23	-	86	69	14582
	1.88	94	75	3902
	3.63	118	100	1299
7.50	-	104	87	16260
	1.49	95	77	8360
	3.53	98	82	3308
	5.11	96	81	1365
	6.50	100	84	764
13.42	-	116	106	20609
	1.75	148	124	8230

3.2.5.4. Efecto de los tamaños y composiciones sobre las características magnéticas de las MNPs con estructura núcleo-coraza

De nuevo, la primera conclusión importante que se extrae a partir de las curvas FC y ZFC y de las medidas de magnetización frente a campo a 300 K es que las diferentes estructuras núcleo-coraza sintetizadas muestran un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente, a pesar de que en algunos casos el tamaño global de las MNPs supera los 20 nm. En lo referente a las magnetizaciones de saturación, no se puede observar una tendencia clara en función de los diferentes espesores de coraza ensayados. En los núcleos de 5.23 nm y en los de 13.42 nm se observa que las magnetizaciones de saturación a 10 K y a 300 K aumentan a medida que se crecen sobre los mismos corazas de óxido de manganeso de progresivamente mayor, mientras que en los núcleos de 7.50 nm la tendencia es la opuesta, si bien en este caso las variaciones se producen en un rango más reducido de valores. En la Figura 3.50 se representan las distintas magnetizaciones de saturación medidas a las dos temperaturas ensayadas frente al peso de la coraza de óxido de manganeso en el volumen total de la estructura núcleo-coraza (se calculó como la razón entre el volumen de la coraza entre

el volumen total de la nanopartícula). Así, se puede comprobar el comportamiento antes descrito: en los núcleos de mayor y menor tamaño las saturaciones aumentan a medida que se incrementa el volumen relativo de las corazas sobre el total de las MNPs, especialmente en los sistemas crecidos sobre núcleos de 13.42 nm, mientras que en los núcleos de tamaño intermedio tienden a mantenerse prácticamente constantes.

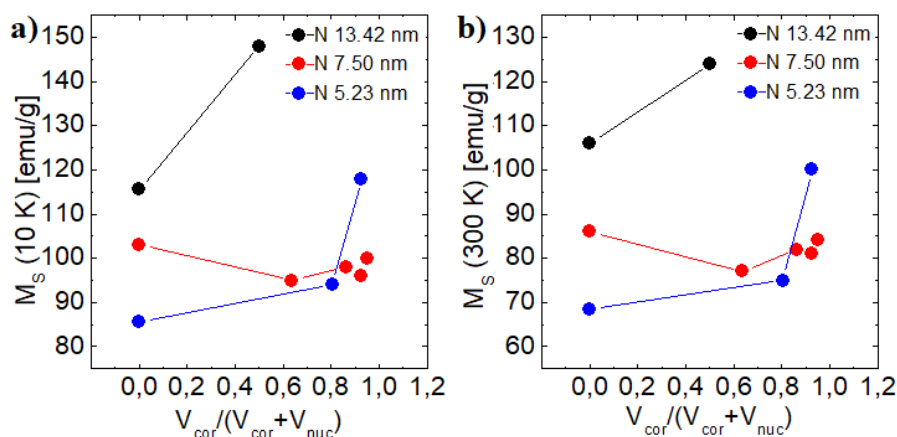


Figura 3.50: Representaciones gráficas de las magnetizaciones de saturación frente al volumen relativo de la coraza de óxido de hierro dopado con manganeso a a) 10 K y b) 300 K. Incertidumbre estimada máxima $\pm 8\%$.

Esta relación aparentemente confusa entre las magnetizaciones de saturación y el volumen relativo de las corazas cobra cierta lógica si consideramos que al crecer las corazas magnéticas compiten dos efectos: por una parte, la presencia creciente de manganeso provoca una sutil disminución de las magnetizaciones de saturación de los nanosistemas y, por otra, el aumento del tamaño de las MNPs da lugar a un aumento en dichas magnitudes³⁷. Así pues, es coherente que en las MNPs con el núcleo de mayor tamaño, 13.42 nm, en las que el manganeso de la coraza tiene un peso porcentual menor, el efecto predominante que afecta a las magnetizaciones de saturación sea el incremento del tamaño de partícula. Por el contrario, en los núcleos de 7.50 nm, donde las corazas suponen una parte importante del porcentaje volúmico de las MNPs, el efecto predominante es la cantidad de manganeso que se manifiesta en unos valores de magnetización de saturación que tienden a decrecer ligeramente al aumentar el espesor de las corazas. Este último efecto debería ser más acusado al crecer las corazas sobre los núcleos de menor tamaño. Sin embargo, en estos se observa que predomina el efecto del incremento de tamaño sobre el efecto de la presencia de manganeso. Esto puede

atribuirse a que al crecer las corazas sobre estos núcleos de tamaño muy reducido se supere un cierto tamaño crítico por debajo del cual las magnetizaciones de saturación decaigan de forma más brusca. Esta observación está en consonancia con estudios previos como el efectuado por Thapa *et al.*⁵¹, quienes observaron una fuerte disminución en la magnetización de saturación de las MNPs de magnetita al pasar de un tamaño de 10 nm a uno de 6.5 nm.

En lo referente al campo coercitivo a baja temperatura de los diferentes sistemas núcleo-coraza sintetizados, estos muestran un comportamiento más definido y prácticamente independiente del tamaño de las MNPs de óxido de cobalto empleadas como núcleos: el campo coercitivo decrece al aumentar el peso porcentual de la coraza sobre el volumen total de las MNPs, y lo hace de una forma prácticamente lineal (Figura 3.51). Como se observó previamente, de los tres elementos dopantes ensayados el que provoca claramente un mayor aumento en el campo coercitivo de los sistemas es el cobalto. Por lo tanto, este es el comportamiento esperado, dado el descenso en la presencia porcentual de cobalto que tiene lugar al crecer corazas de óxido de manganeso de espesores crecientes. En este caso también tiene lugar una competencia entre el porcentaje decreciente de cobalto y el aumento de tamaño global de partícula al crecer las corazas; no obstante, el primero de estos efectos se muestra como claramente dominante. La disminución del campo coercitivo a baja temperatura con el peso relativo de la coraza sucede de forma aproximadamente lineal en los sistemas basados en los núcleos de óxido de cobalto a los tres tamaños ensayados. El ritmo de variación es prácticamente idéntico en las estructuras crecidas sobre los núcleos de 7.50 y 5.23 nm, mientras que es ligeramente más abrupto en los núcleos de 13.42 nm. La explicación de este hecho se puede hallar en la menor presencia de cobalto que hay en estos núcleos de mayor tamaño ($\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$) con respecto a la detectada en los otros dos (ca. $\text{Co}_{0.80}\text{Fe}_{2.20}\text{O}_4$), lo cual provoca que la presencia global de cobalto en las estructuras núcleo-coraza sintetizadas empleando estos como semilla decaiga a valores muy reducidos sin necesidad de crecer recubrimientos de óxido de manganeso de gran espesor.

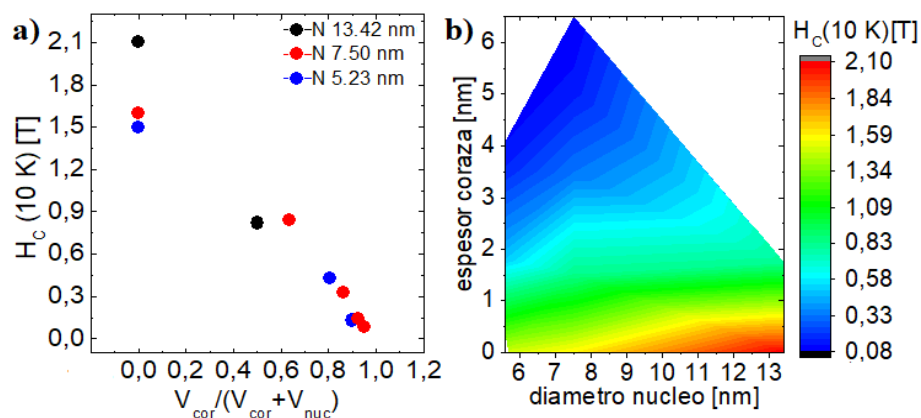


Figura 3.51: a) Representación gráfica del campo coercitivo a 10 K frente al volumen relativo de la coraza de óxido de hierro dopado con manganeso, y b) mapa de color del campo coercitivo a 10 K en función de los tamaños de núcleo y coraza.

Para finalizar, se caracterizó magnéticamente el sistema de MNPs con núcleo de óxido de cobalto de 13.42 nm y coraza de óxido de manganeso de 1.75 nm, efectuando dichas medidas magnéticas previamente a la eliminación de la abundante cantidad de precursores de la coraza magnética que nuclearon dando lugar a multitud de pequeñas MNPs independientes. Si se compara con el sistema analizado en páginas previas, dónde este manganeso nucleado sí fue eliminado, se observa que este último presenta unas magnetizaciones de saturación más altas, consecuencia lógica de la menor presencia de manganeso (Figura 3.52).

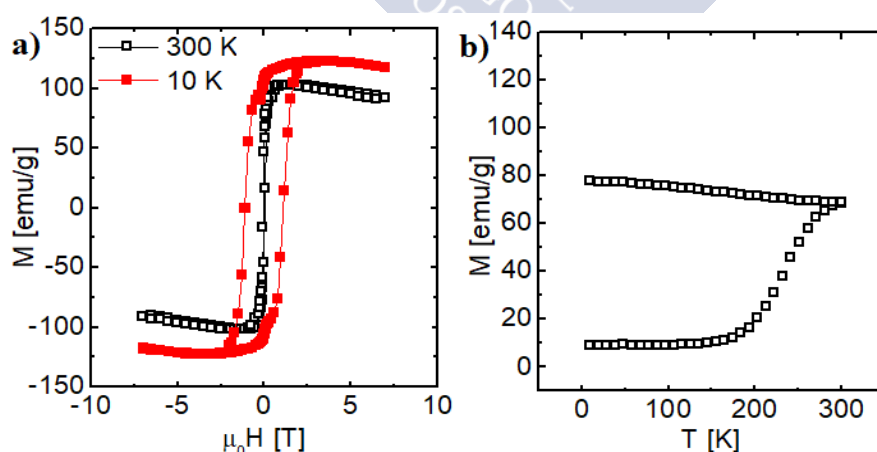


Figura 3.52: a) Ciclos de histéresis magnética a 10 K y a 300 K, y b) curvas FC-ZFC de las Co@MnMNPs con núcleo de óxido de cobalto de 13.42 nm y coraza de óxido de manganeso de 1.75 nm con abundante nucleación de materiales precursores de la coraza.

La relevancia de las gráficas de magnetización frente al campo magnético aplicado del sistema en el que los precursores de la coraza nucleados no fueron eliminados proviene de la observación de un punto de inflexión previo a alcanzar la magnetización de saturación (Figura 3.53a). Este fenómeno también se puede observar, aunque de forma mucho menos clara, en las gráficas obtenidas tras la eliminación del material nucleado (nótese que se consiguieron eliminar gran parte de las MNPs de muy reducido tamaño, pero no en su totalidad) (Figura 3.53b), lo que indica que la existencia de dos poblaciones de MNPs es la causa de dicho punto de inflexión. Asimismo, también es notorio que este comportamiento no se producía, ni siquiera de forma leve, en ninguno de las partículas en los que la coraza creció de la forma esperada en ausencia de MNPs independientes nucleadas. De esta forma, se concluye que la aparición de estos puntos de inflexión en las curvas de magnetización es debida a la existencia de más de una población de MNPs de diferentes características magnéticas en los sistemas estudiados, y no es causada por fenómenos de desacoplamiento entre núcleos y corazas magnéticas. Este desacoplamiento, base del conocido como efecto “exchange-bias”,⁵² sucede en estructuras en las que fases con diferente comportamiento magnético se encuentran en contacto. Sin embargo, en el caso de los sistemas núcleo-coraza sintetizados en este apartado las dos fases de la estructura dual presentan ordenamiento ferrimagnético, por lo que este fenómeno de desacoplamiento no es especialmente relevante.

A este respecto, en algún trabajo previo se sintetizaron MNPs con una estructura y una composición similar a la de los sistemas núcleo-coraza preparados en el presente Capítulo, observándose en algunos casos ciclos de histéresis con pequeños puntos de inflexión como los previamente detallados. Así, por ejemplo, Casavola *et al.*⁵³ obtuvieron MNPs en forma de hélice con unas dimensiones de ca. 20 nm consistentes en MNPs de óxido de hierro con pequeñas estructuras de óxido de cobalto pegadas a su superficie. Los puntos de inflexión observados en los ciclos de histéresis de estas MNPs fueron asociados en primera instancia a la débil interacción entre los diferentes momentos magnéticos en la interfase entre los óxidos de hierro y cobalto. Sin embargo, de las observaciones efectuadas en nuestras partículas se concluye que el probable origen de esos comportamientos se encuentre en el ligero grado de agregación y la consecuente leve polidispersidad en cuanto a tamaños, morfologías y, por tanto, comportamientos magnéticos, de las muestras preparadas por dichos autores.

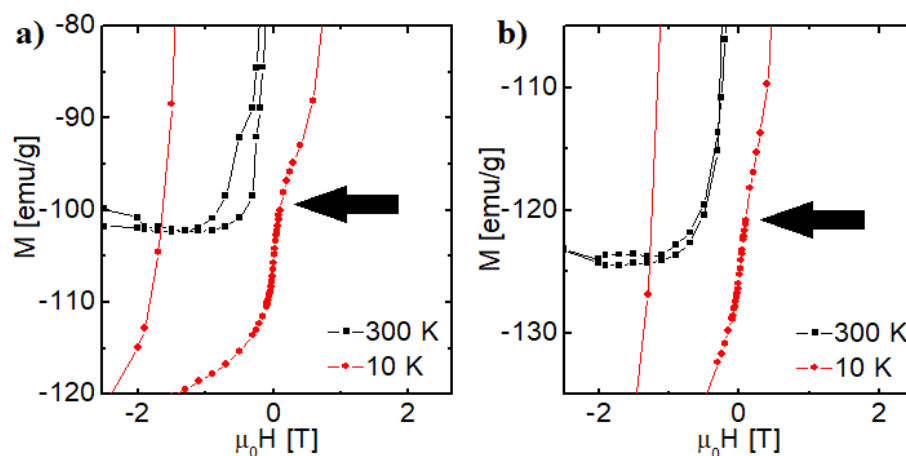


Figura 3.53: Imágenes aumentadas de las curvas de magnetización frente a campo aplicado, en las zonas dónde se produce una inflexión, de las Co@MnMnPs con núcleo de 13.42 nm y coraza de 1.75 nm a) sin eliminar material nucleado y b) tras eliminar material nucleado.

En resumen, en este apartado de caracterización magnética se midieron los ciclos de histéresis y las curvas FC y ZFC de todas las MNPs dopadas de ca. 8-9 nm de diámetro y de las estructuras núcleo-coraza sintetizadas en apartados previos. De este modo, se determinó, en primer lugar, que todos los sistemas mostraban un comportamiento superparamagnético a 300 K, presentando unas temperaturas de bloqueo inferiores a la misma y, por tanto, unos ciclos de histéresis de área prácticamente nula a temperatura ambiente. En las ferritas dopadas se efectuó un análisis exhaustivo de la influencia de los distintos dopajes implementados sobre las magnitudes características de los ciclos de histéresis de los sistemas obtenidos, concluyéndose que las presencias de cobalto y zinc contribuyen de forma significativa al incremento de los campos coercitivos y de las magnetizaciones de saturación, respectivamente. La influencia del manganeso, si bien menor, debe ser considerada para no limitar con una presencia excesiva los efectos sobre las características magnéticas de los otros dos elementos dopantes. En las estructuras núcleo-coraza, por su parte, se determinó que el campo coercitivo disminuye al crecer corazas de óxido de manganeso sobre los núcleos de óxido de cobalto, observándose una dependencia prácticamente lineal entre dicha magnitud y el peso porcentual de las corazas sobre el volumen total de las MNPs. En lo referente a las magnetizaciones de saturación, la relación entre estas y el espesor de las corazas es menos clara, variando según cuál sea el tamaño de los núcleos usados como semilla. Presumiblemente, este comportamiento poco definido se

debe a la competencia entre dos efectos que se manifiestan al crecer corazas sucesivamente más grandes: la creciente presencia de manganeso, que tiende a disminuir las saturaciones ligeramente, y el consiguiente aumento del tamaño global de las MNPs, el cual aumenta dichas magnitudes.

3.3. Bibliografía

1. Beik, J. *et al.* Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *J. Control. Release* **235**, 205–221 (2016).
2. Périgo, E. A. *et al.* Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Appl. Phys. Rev.* **2**, 041302 (2015).
3. Lee, N. & Hyeon, T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2575–2589 (2012).
4. Jin, R., Lin, B., Li, D. & Ai, H. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: Design considerations and clinical applications. *Curr. Opin. Pharmacol.* **18**, 18–27 (2014).
5. McKeehan, L. W. Physical theory of ferromagnetic domains [37]. *Phys. Rev.* **79**, 745 (1950).
6. Weinstein, J. S. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 15–35 (2010).
7. Luo, X. *et al.* Adsorption of As (III) and As (V) from water using magnetite Fe₃O₄-reduced graphite oxide-MnO₂ nanocomposites. *Chem. Eng. J.* **187**, 45–52 (2012).
8. Feng, L., Cao, M., Ma, X., Zhu, Y. & Hu, C. Superparamagnetic high-surface-area Fe₃O₄ nanoparticles as adsorbents for arsenic removal. *J. Hazard. Mater.* **217–218**, 439–446 (2012).

9. Zhang, Q. *et al.* Model Driven Optimization of Magnetic Anisotropy of Exchange-Coupled Core-Shell Ferrite Nanoparticles for Maximal Hysteretic Loss. *Chem. Mater.* **27**, 7380–7387 (2015).
10. Zeng, H., Rice, P. M., Wang, S. X. & Sun, S. Shape-Controlled Synthesis and Shape-Induced Texture of MnFe_2O_4 Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11458–11459 (2004).
11. Chen, R., Christiansen, M. G. & Anikeeva, P. Maximizing hysteretic losses in magnetic ferrite nanoparticles via model-driven synthesis and materials optimization. *ACS Nano* **7**, 8990–9000 (2013).
12. Pellegrino, T. *et al.* Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: A general route to water soluble nanocrystals. *Nano Lett.* **4**, 703–707 (2004).
13. Soliman, M. G., Pelaz, B., Parak, W. J. & Del Pino, P. Phase transfer and polymer coating methods toward improving the stability of metallic nanoparticles for biological applications. *Chem. Mater.* **27**, 990–997 (2015).
14. Lin, C. A. J. *et al.* Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization. *Small* **4**, 334–341 (2008).
15. Sze, A., Erickson, D., Ren, L. & Li, D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *J. Colloid Interface Sci.* **261**, 402–410 (2003).
16. Hühn, J. *et al.* Selected standard protocols for the synthesis, phase transfer, and characterization of inorganic colloidal nanoparticles. *Chem. Mater.* **29**, 399–461 (2017).
17. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. & Kim, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 023501 (2015).
18. Pardo, A. *et al.* Analysis of the influence of synthetic parameters on the structure and physico-chemical properties of non-spherical iron oxide nanocrystals and their biological stability and compatibility. *Dalt. Trans.* **45**, 797–810 (2015).

19. Huda, N. SPINELS (Normal or Inverse) - All about Chemistry. (2016). Available at: <http://www.chemohollic.com/2016/07/spinels-normal-or-inverse.html>.
20. Liang, X. *et al.* The valence and site occupancy of substituting metals in magnetite spinel structure $\text{Fe}_{3-x}\text{M}_x\text{O}_4$ (M = Cr, Mn, Co and Ni) and their influence on thermal stability. *Solid State Sci.* **15**, 115–122 (2013).
21. Atomic Radius of the elements. Atomic Radius for all the elements in the Periodic Table. *Atomic Radius of the elements* Available at: <http://periodictable.com/Properties/A/AtomicRadius.v.html>. (Accessed: 28th August 2018)
22. Jiang, J., Oberdörster, G. & Biswas, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanoparticle Res.* **11**, 77–89 (2009).
23. Schweiger, C. *et al.* Quantification of the internalization patterns of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with opposite charge. *J. Nanobiotechnology* **10**, 28 (2012).
24. Marques, M. R. C., Loebenberg, R. & Almukainzi, M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol.* **18**, 15–28 (2011).
25. Grootveld, M. & Halliwell, B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of free-radical reactions in vivo? *Biochem. J.* **243**, 803–8 (1987).
26. Lynch, I. & Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **3**, 40–47 (2008).
27. Ghosh Chaudhuri, R. & Paria, S. Core/shell nanoparticles: Classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chem. Rev.* **112**, 2373–2433 (2012).
28. Chatterjee, K., Sarkar, S., Jagajjanani Rao, K. & Paria, S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **209**, 8–39 (2014).

29. Noh, S. H. *et al.* Nanoscale magnetism control via surface and exchange anisotropy for optimized ferrimagnetic hysteresis. *Nano Lett.* **12**, 3716–3721 (2012).
30. Lee, J. H. *et al.* Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 418–422 (2011).
31. Serantes, D. & Baldomir, D. Superparamagnetism and Monte Carlo simulations. *Open Surf. Sci. J.* **4**, 71 (2012).
32. Alborzi, Z., Hassanzadeh, A. & Golzan, M. M. Superparamagnetic Behavior of the Magnetic Hysteresis Loop. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol* **8**, 93–98 (2012).
33. Liu, Z. L. *et al.* Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. *J. Mater. Synth. Process.* **10**, 83–87 (2002).
34. Hansen, M. F. & Mørup, S. Estimation of blocking temperatures from ZFC/FC curves. *J. Magn. Magn. Mater.* **203**, 214–216 (1999).
35. Kötitz, R., Weitschies, W., Trahms, L. & Semmler, W. Investigation of Brownian and Néel relaxation in magnetic fluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **201**, 102–104 (1999).
36. Martinez-Boubeta, C. *et al.* Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications. *Sci. Rep.* **3**, 1652 (2013).
37. Caruntu, D., Caruntu, G. & O'Connor, C. J. Magnetic properties of variable-sized Fe₃O₄ nanoparticles synthesized from non-aqueous homogeneous solutions of polyols. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **40**, 5801–5809 (2007).
38. Kolen'Ko, Y. V. *et al.* Large-scale synthesis of colloidal Fe₃O₄ nanoparticles exhibiting high heating efficiency in magnetic hyperthermia. *J. Phys. Chem. C* **118**, 8691–8701 (2014).
39. Szotek, Z. *et al.* Electronic structures of normal and inverse spinel ferrites from first principles. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **74**, 174431 (2006).
40. Cornell, R. M. & Schwertmann, U. *The Iron Oxides*. (Wiley-VCH Verlag GmbH

& Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/3527602097

41. Kimling, J. *Magnetization Reversal in Cylindrical Nanowires and in Nanowires with Perpendicular Magnetic Anisotropy*. (2013).
42. Sathya, A. *et al.* CoFe_{3-x}O₄ Nanocubes for Theranostic Applications: Effect of Cobalt Content and Particle Size. *Chem. Mater.* **28**, 1769–1780 (2016).
43. Fantechi, E., Innocenti, C., Albino, M., Lottini, E. & Sangregorio, C. Influence of cobalt doping on the hyperthermic efficiency of magnetite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **380**, 365–371 (2015).
44. Byrne, J. M. *et al.* Biosynthesis of zinc substituted magnetite nanoparticles with enhanced magnetic properties. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 2518–2529 (2014).
45. Zélis, P. M. *et al.* Structural and magnetic study of zinc-doped magnetite nanoparticles and ferrofluids for hyperthermia applications. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **46**, 125006 (2013).
46. Yelenich, O. V., Solopan, S. O., Trachevskii, V. V. & Belous, A. G. Synthesis and properties of AFe₂O₄ (A = Mn, Fe, Co, Ni, Zn) nanoparticles produced by deposition from diethylene glycol solution. *Russ. J. Inorg. Chem.* **58**, 901–905 (2013).
47. Chi, H., Tan, G., Kanatzidis, M. G., Li, Q. & Uher, C. A low-temperature study of manganese-induced ferromagnetism and valence band convergence in tin telluride. *Applied Physics Letters* **108**, (2016).
48. Margabandhu, M., Sendhilnathan, S. & Hirthna. Impact of Manganese Dopant on Structural, Morphological and Magnetic properties of coated CoFe₂O₄ nanoparticles. *Adv. Nat. Appl. Sci.* **11**, 341–346 (2017).
49. Hocheplid, J. F. & Pileni, M. P. Magnetic properties of mixed cobalt-zinc ferrite nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **87**, 2472–2478 (2000).
50. Ferrari, S., Apesteguy, J. C. & Saccone, F. D. Structural and Magnetic Properties of Zn-Doped Magnetite Nanoparticles Obtained by Wet Chemical Method. *IEEE Trans. Magn.* **51**, 1–6 (2015).

51. Thapa, D., Palkar, V. R., Kurup, M. B. & Malik, S. K. *Properties of magnetite nanoparticles synthesized through a novel chemical route. Materials Letters* **58**, (2004).
52. Nogués, J. & Schuller, I. K. Exchange bias. *J. Magn. Magn. Mater.* **192**, 203–232 (1999).
53. Casavola, M. *et al.* Exchange-coupled bimagnetic cobalt/ iron oxide branched nanocrystal heterostructures. *Nano Lett.* **9**, 366–376 (2009).



4. Sistemas ordenados de nanopartículas de óxido de hierro en película delgada

En este Capítulo se presentarán los procesos de síntesis y caracterización de sistemas ordenados/películas delgadas de nanopartículas magnéticas (MNPs) de óxido de hierro obtenidas sobre sustratos de silicio mediante la técnica de litografía de copolímeros de bloque. Esta técnica, como se comentó en la Introducción de la presente Tesis, permite un gran control sobre el tamaño, disposición, densidad e inter-distancia de las MNPs^{1,2}, suponiendo además un procedimiento más rápido y menos costoso que otros métodos alternativos como, por ejemplo, la litografía electrónica o la fotolitografía³. Así, se analizará cómo afecta la modificación de diferentes parámetros del proceso sintético a las características de los nanosistemas obtenidos. El objetivo que se persigue es la consecución de conjuntos altamente ordenados de MNPs en la totalidad del área de los sustratos, característica esta de suma importancia de cara a su implementación en potenciales aplicaciones en campos como, por ejemplo, el almacenamiento de información, la producción y almacenamiento de energía o la catálisis^{4,5}.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Materiales

El copolímero de bloque empleado para la síntesis de los sistemas ordenados de MNPs mediante litografía de copolímeros de bloque fue un copolímero de la familia de los poliestireno-*block*-poli-4-vinilpiridina (PS-*b*-P4VP) ya que:

- i) Ofrece la posibilidad de ser depositado en películas delgadas formando patrones ordenados y periódicos, con microdominios orientados perpendicularmente a la superficie del sustrato^{6,7,8,9}. Como ya se comentó en el Capítulo introductorio, este control sobre el ordenamiento, espaciado y orientación de los microdominios

poliméricos es clave para su aplicación como plantillas de cara a la obtención de sistemas ordenados de NPs.

ii) Tanto el bloque de P4VP como, en menor medida, el bloque de PS presentan una elevada afinidad por sustratos polares (como, por ejemplo, los de silicio) lo que permite el uso de estos como soporte para la preparación de las películas delgadas.

iii) El bloque de P4VP presenta también una elevada afinidad por diferentes compuestos organometálicos, los cuales pueden ser empleados como precursores de los sistemas magnéticos nanoparticulados/nanoestructurados^{6,8,10}.

El copolímero dibloque de la familia de los PS-*b*-P4VP (*Polymer Source Inc.*) utilizado en el desarrollo de este trabajo poseía un peso molecular de 59000 g·mol⁻¹, en el que la masa de las cadenas de PS era de 31500 g·mol⁻¹ y el de las cadenas de P4VP de 17500 g·mol⁻¹, respectivamente. Por otra parte, se usó el compuesto organometálico ácido ferroceneacético (FAA) (*TCI*, pureza 95%) como precursor de las MNPs de óxido de hierro. Este compuesto presenta una alta afinidad por los bloques de P4VP, uniéndose a los mismos mediante puentes de hidrógeno^{6,11} (Figura 4.1a). Esto permite que, gracias al autoensamblaje del copolímero al ser depositado en la forma de película delgada, las moléculas de FAA y, por tanto, las MNPs de óxido de hierro a las que darán lugar, se dispongan de forma ordenada sobre los sustratos siguiendo el patrón preformado por el copolímero de bloque.

Finalmente, los disolventes selectivos empleados fueron dioxano (*Sigma Aldrich*, pureza 99.8%), tolueno (*Sigma-Aldrich*, pureza 99.8%) y tetrahidrofurano (THF) (*Panreac*, pureza 99.5%), que fueron usados tal y como se recibieron. El dioxano es selectivo para el bloque PS del copolímero, pero no así para el bloque P4VP ni, en consecuencia, para el complejo P4VP-FAA. Esto permitirá que el copolímero en disolución se disponga en forma de micelas en las que las cadenas del bloque insoluble de P4VP se encuentren en el núcleo micelar y las cadenas del bloque de PS en la corona (Figura 4.1b), lo cual dará lugar a la formación de microdominios de P4VP cuando el sistema se prepare en forma de película delgada. Por su parte, el tolueno presenta un carácter aún más selectivo que el dioxano para el bloque de PS, por lo que se añade un 20% (v/v) de THF (selectivo para el P4VP) a fin de controlar el tamaño de las micelas poliméricas y, por tanto, de los posteriores microdominios de la película delgada.

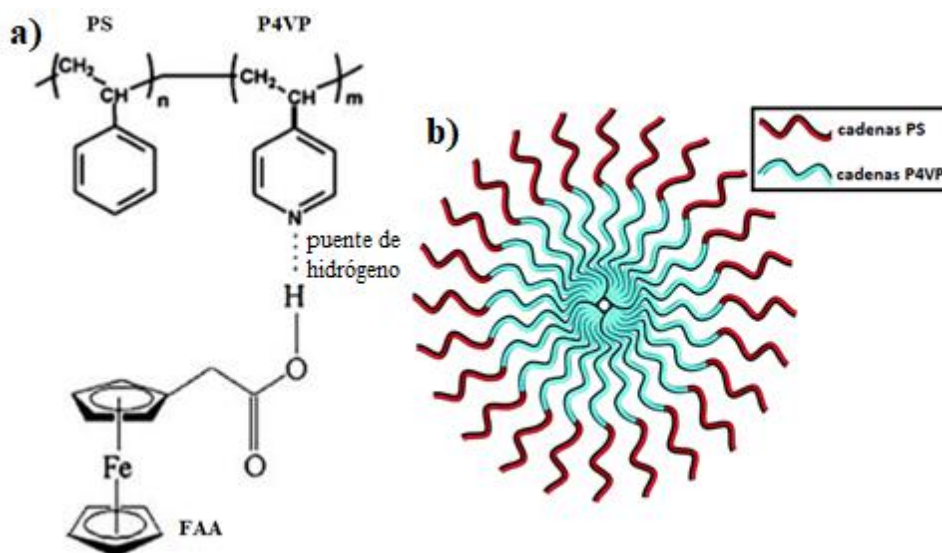


Figura 4.1: a) Esquema representando la unión del FAA con el P4VP mediante puentes de hidrógeno. Adaptada de la ref. 6. Copyright (2011) con permiso de Wiley-Blackwell y b) esquema de la estructura de las micelas de PS-*b*-P4VP en un disolvente selectivo para los bloques de PS.

Los sustratos de silicio sobre los que se prepararon las películas delgadas tenían dimensiones de 10×10 mm y fueron adquiridos en *Ted-Pella Inc.* Previamente a su utilización, se limpiaron sometiéndolos a ultrasonidos sumergidos en diclorometano (pureza 99.9%) durante 15 min. para, a continuación, introducirlos en una mezcla 75:25 (v/v) de ácido sulfúrico (37% v/v en agua) y peróxido de hidrógeno (disolución piraña)¹² durante 1 h. Estos tres últimos reactivos fueron comprados en *Sigma-Aldrich* y usado sin purificación extra. Finalmente, los sustratos se enjuagaron con agua pura repetidas veces y, posteriormente, se secaron en un flujo de nitrógeno.

4.1.2. Síntesis de las películas delgadas.

Las síntesis de los sistemas ordenados de MNPs de óxido de hierro en película delgada se llevaron a cabo siguiendo un protocolo previamente publicado por Kuila *et al.*⁶ con diferentes modificaciones, analizándose la influencia de la variación de diferentes parámetros del proceso sintético en las características de los sistemas nanoestructurados obtenidos. Esta ruta sintética sigue el llamado enfoque supramolecular ya explicado en la Introducción de la presente Tesis Doctoral que se

basa, a muy grandes rasgos, en que el copolímero y el compuesto precursor de las MNPs se mezclan y se hacen reaccionar *in situ* antes de la preparación de la película delgada¹³.

De esta manera, se partió de disoluciones de FAA y de PS-*b*-P4VP de igual volumen preparadas por separado, usando como disolvente bien dioxano o bien una mezcla 80:20 (v/v) de tolueno y THF. Las concentraciones de las disoluciones poliméricas fueron de 10 mg·ml⁻¹, y una vez preparadas se introdujeron en una estufa a 70 °C durante aproximadamente 2 h a fin de facilitar la correcta difusión del polímero gracias al efecto de la temperatura. Por su parte, las concentraciones de las disoluciones de FAA se variaron en el rango de 1.72 mg·ml⁻¹ a 27.54 mg·ml⁻¹ para, de esta forma, analizar la influencia de diferentes razones molares (cinco) entre los bloques de P4VP y el precursor organometálico en las nanoestructuras obtenidas: 1/0.25, 1/0.50, 1/1.00, 1/2.50 y 1/4.00.

Posteriormente, la disolución de FAA y la del copolímero de bloque se mezclaron añadiendo esta última sobre la primera gota a gota; una vez efectuada esta mezcla, se dejó que la disolución resultante reaccionase durante 8 h. A este respecto, se probaron diferentes temperaturas de mezcla, próximas a las temperaturas de ebullición de los distintos disolventes, y diferentes temperaturas de reacción, como se explicará más adelante. Una vez finalizado el tiempo de reacción se prepararon las películas delgadas sobre los sustratos de silicio mediante la técnica de espín-coating, utilizando un equipo espín-coater modelo WS-650MZ-23NPP (Laurell Technologies Inc.). Para cada película delgada se utilizaron 100 µl de disolución que se depositaron sobre el sustrato antes de iniciar el giro del mismo a 2000 rpm durante 60 s en condiciones ambientales. Estos parámetros son suficientes para que la práctica totalidad del disolvente se evapore del sustrato tras el proceso de revolución. Tras preparar las películas delgadas, estas se sometieron bien a un vacío primario de 100 mbar durante 12 h¹⁴ o a una atmósfera saturada de vapor de dioxano durante 96 h¹⁵ (Figura 4.2), procesos con los que se buscó acelerar la formación de los microdominios poliméricos sobre los sustratos de silicio mientras se mejoraba su uniformidad. Estos métodos permiten alcanzar más rápidamente la arquitectura final de la película delgada puesto que aumentan la movilidad de las cadenas poliméricas, bien creando un ambiente de presión reducida o bien mediante la saturación con vapores de un disolvente parcialmente selectivo, respectivamente.

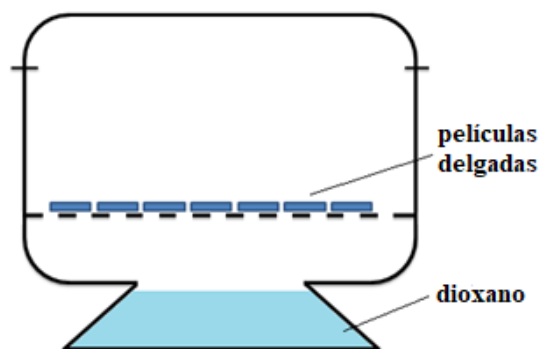


Figura 4.2: Esquema del montaje utilizado para someter las películas delgadas a una atmósfera saturada de vapor de dioxano en recipiente sellado.

La última etapa del proceso de síntesis consistió en reducir el FAA localizado en los microdominios de P4VP para, así, convertirlo en óxido de hierro y, a continuación, eliminar el patrón polimérico de la superficie del sustrato de silicio, logrando de esta forma el patrón ordenado de MNPs. Se ensayaron dos procedimientos diferentes para este último paso: la aplicación de un tratamiento de plasma de oxígeno¹⁶ a la película delgada o su calcinación a temperatura elevada¹⁷ (Figura 4.3). Al introducir las películas delgadas en plasma de oxígeno (equipo modelo *Femto PEECE*, de la marca *Diener Technologies*), este reacciona con los radicales libres del FAA, reduciéndolo y dando lugar a las MNPs de óxido de hierro. Por su parte, al reaccionar con el copolímero se generan moléculas de H_2O , CO , CO_2 y otros hidrocarburos de bajo peso molecular que se caracterizan por una alta presión de vapor y que son eliminados cuando se evacúa el gas de la cámara en la que tiene lugar el proceso. Los tratamientos con plasma de oxígeno efectuados se realizaron a una potencia de 50 W y a una presión de 0.2 mbar, con un tiempo de exposición entre 5 y 15 min. Finalmente, con el objetivo de eliminar posibles trazas de material polimérico que pudiesen permanecer sobre los sustratos, estos fueron sumergidos en cloroformo y sometidos a ultrasonidos durante 30 s.

Por otra parte, con el proceso de calcinación de las películas delgadas se persiguieron los mismos objetivos que con el tratamiento de plasma de oxígeno, pero en esta ocasión la reducción del FAA para formar el óxido de hierro tiene lugar por descomposición a alta temperatura, y la eliminación del polímero sucede por un simple proceso de pirólisis. Así, antes de someter las películas delgadas a temperaturas elevadas, estas se irradiaron con un haz de luz ultravioleta (UV) de 254 nm durante un

período de 45 min. con el objetivo de limitar el movimiento de las cadenas poliméricas (proceso de entrecruzamiento) durante el calentamiento posterior, para que de este modo el orden establecido en la película delgada en las etapas previas del proceso de síntesis no se vea perturbado⁶. Se utilizó una lámpara UV de la marca *VL4-LC* con una potencia de 4 W. Los tratamientos de calcinación ensayados se efectuaron a temperaturas entre 450 °C y 1000 °C con una duración de 120 min., usando un horno de mufla modelo *STM-3-10* de la marca *Sante*.

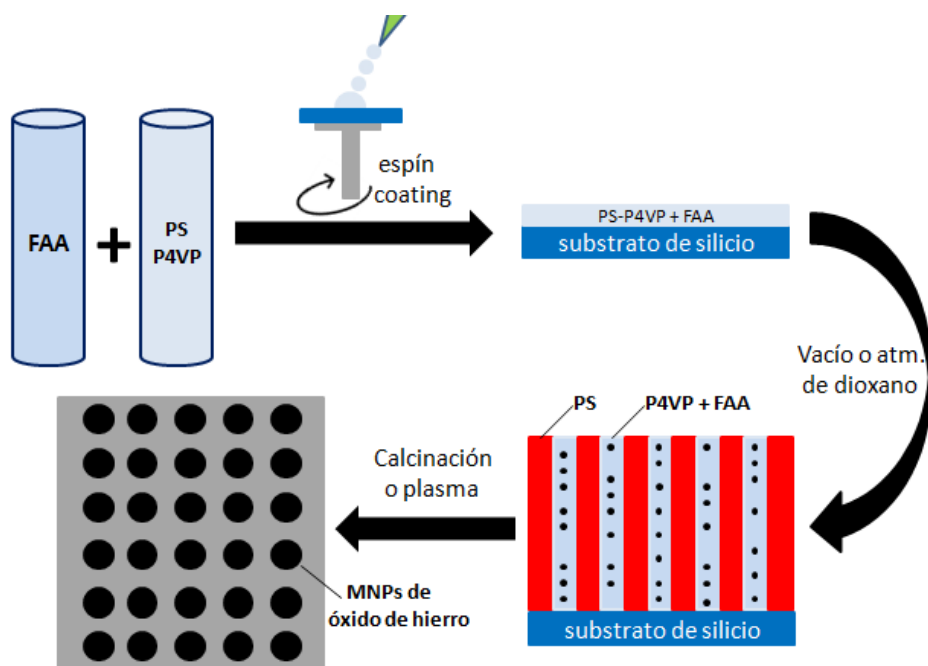


Figura 4.3: Esquema de las diferentes etapas del proceso de síntesis de los nanosistemas ordenados de MNPs de óxido de hierro en película delgada.

En ciertos casos, se sintetizaron también películas delgadas mediante varias deposiciones por espín-coating sucesivas para generar películas de mayor espesor y, por tanto, con una mayor cantidad de material magnético resultante, siguiendo un tratamiento posterior similar al de las sintetizadas mediante espín-coating simple.

4.1.3. Técnicas de caracterización

Los sistemas obtenidos fueron caracterizados, en primera instancia, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) empleando un microscopio electrónico de

barrido modelo *ZEISS FESEM ULTRA Plus* operado a 3 kV en un rango de 30000 a 300000X. También se utilizó un microscopio de fuerza atómica modelo *XEI-100 (Park Systems)* funcionando en modo no contacto, con una punta de silicio con una constante elástica de $40 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ y una frecuencia de resonancia de 300 KHz.

Las medidas de espectroscopía de rayos X por difracción de electrones (EDS) se efectuaron en el microscopio electrónico de barrido operado este a un voltaje de entre 10 y 20 kV, mientras que las pruebas de difracción y reflectometría de rayos X se llevaron a cabo en un difractómetro de rayos X (modelo *Empyran, PanAnalytica*) equipado con un goniómetro de cinco ejes. Los rayos X se obtuvieron en un tubo de cobre sellado modelo *Empyran Cu LFFHR*, y la radiación se monocromatizó con una óptica de alta resolución de tipo híbrido, adecuada para caracterizar monocapas menores de 100 nm. La detección de rayos X se efectuó con un detector de área tipo *PanAnalytical PIXcel-3D*. Los difractogramas de rayos X se midieron en el rango angular 10° - 85° con un paso de 0.02° y un tiempo de paso de 2 s. En las curvas de reflectometría de rayos X se estudió el rango angular de incidencia comprendido entre 0.15° y 0.85° , con un paso de ángulo de 0.01° y un tiempo de paso de 2 s.

Por último, la caracterización magnética de los sistemas fue efectuada en un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) modelo *DMS-1660*. Las curvas de magnetización de las muestras estudiadas se midieron a temperaturas de 5 y 300 K desde -50000 Oe a +50000 Oe con un paso de 50 Oe a campos magnéticos bajos (inferiores a 500 Oe), un paso de 100 Oe a campos magnéticos intermedios (comprendidos entre 500 y 1500 Oe) y un paso de 500 Oe a campos magnéticos elevados (superiores a 1500 Oe). ($1 \text{ T} = 10^4 \text{ Oe}$).

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Variación de los parámetros de síntesis: Optimización del proceso de preparación de las películas delgadas.

En este apartado se discutirá la influencia de diferentes parámetros en el proceso de síntesis de ensamblajes ordenados de MNPs de óxido de hierro en película delgada (Figura 4.4). En función del aspecto de los nanosistemas obtenidos, caracterizados en primera instancia mediante SEM¹⁸, se discutirá qué variables del proceso de preparación

de las películas delgadas son las óptimas para lograr aquellas con la mejor calidad posible.

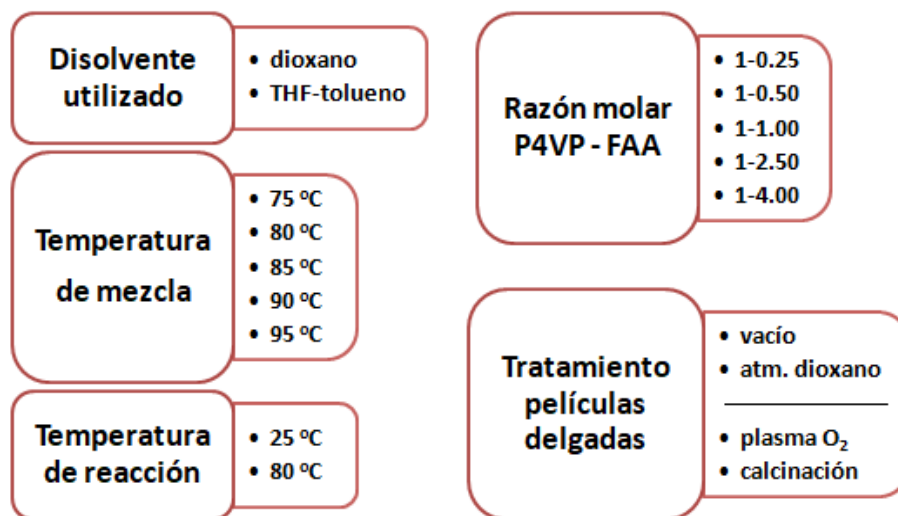


Figura 4.4: Representación esquemática de las diferentes variables sintéticas que se estudiaron en la optimización del proceso de preparación de las películas delgadas.

4.2.1.1. Estudio del efecto del disolvente

El primer análisis efectuado se centró en la elección del disolvente selectivo más adecuado para la preparación de las disoluciones de PS-*b*-P4VP y de FAA. Para ello, se ensayaron dos disolventes diferentes: dioxano y una mezcla 80:20 (v/v) de tolueno y THF. Como ya se comentó con anterioridad, se trata en ambos casos de disolventes con alta afinidad por las cadenas de PS pero no así por las de P4VP, de forma que el copolímero PS-*b*-P4VP se constituirá en forma de micelas al ser disuelto en el seno de los mismos, lo que a su vez terminará por dar lugar a la estructuración en forma de microdominios al preparar las películas delgadas. En trabajos previos como el efectuado por Kuila *et al.*⁶ se empleó dioxano como disolvente selectivo, mientras que otros autores como Shin *et al.*⁸ o Park *et al.*¹⁹ emplearon la mezcla tolueno:THF en proporciones similares a la 80:20 (v/v) antes indicada. Debido a la existencia de estas diferencias entre protocolos sintéticos, se llevó a cabo este ensayo preliminar para comprobar si podían existir importantes diferencias en la conformación y características de las nanoestructuras magnéticas resultantes al emplear un disolvente selectivo u otro.

A modo de prueba, se prepararon dos disoluciones de PS-*b*-P4VP de concentración $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y dos disoluciones de FAA de concentración $17.21 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, usando en una de ellas dioxano como disolvente y en otra la mezcla 80:20 (v/v) tolueno y THF. Estas concentraciones implican una razón molar entre P4VP y FAA de 1/2.50. Posteriormente, las disoluciones poliméricas fueron añadidas gota a gota sobre las disoluciones de FAA a temperaturas de mezcla próximas a la temperatura de ebullición de los disolventes: 75°C para la mezcla tolueno:THF y 80°C para el dioxano. Las dos disoluciones mezcla permanecieron reaccionando a temperatura ambiente durante 8 h antes de preparar con cada una de ellas dos películas delgadas mediante la técnica de espín-coating bajo condiciones ambientales a 2000 rpm durante 60 s. A continuación, las películas delgadas se sometieron a un vacío primario de 100 mbar durante 12 h para acelerar la conformación de los microdominios poliméricos. Este ensayo también sirvió para evaluar, de forma preliminar y simultánea, el efecto del tiempo exposición de las muestras al plasma de oxígeno, aplicando a cada una de las dos películas delgadas sintetizadas con cada disolvente selectivo tiempos de exposición al plasma de 5 y 10 min., respectivamente. Por último, las películas fueron sumergidas en cloroformo e introducidas en un baño de ultrasonidos durante 30 s a fin de eliminar el posible exceso polimérico aún presente en las muestras tras los tratamientos con plasma de oxígeno. En la Figura 4.5 se muestran las imágenes de SEM de cada una de las cuatro muestras.

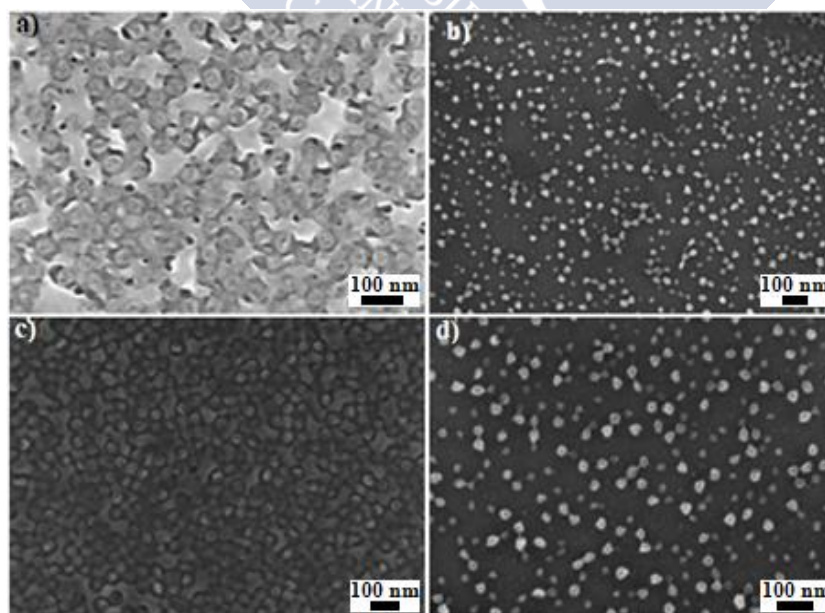


Figura 4.5: Imágenes SEM de las películas delgadas preparadas en: tolueno:THF expuestas a plasma durante a) 5 y c) 10 min.; dioxano expuestas a plasma durante b) 5 y d) 10 min.

Se pueden observar diferencias evidentes entre las muestras preparadas en tolueno:THF (Figuras 4.5a y 4.5c) y las muestras preparadas en dioxano (Figuras 4.5b y 4.5d). Si bien en ninguno de los dos casos el ordenamiento de los sistemas resultantes del proceso sintético es tan elevado como se pretendía, sí se puede comprobar que en las películas delgadas en las que se utilizó dioxano como disolvente las MNPs están presentes de forma mucho más nítida, mientras que en las de tolueno:THF existe aún una importante cantidad de polímero no eliminado, a pesar del tratamiento con plasma, y una incompleta formación de las MNPs, intuyéndose estas unidas entre sí en una formación de cadena de cuentas. En relación a los tiempos de plasma de oxígeno aplicados, las diferencias entre las imágenes de SEM de las muestras preparadas no son demasiado importantes para ninguno de los dos disolventes, aunque sí se observa que las películas delgadas tratadas durante 10 min. semejan estar más limpias que las tratadas durante 5 min., sin afectar aparentemente a las características morfológicas de las MNPs resultantes. Por todo ello, se concluye de este primer ensayo la conveniencia de emplear dioxano como disolvente para las disoluciones de PS-*b*-P4VP y FAA precursoras de las películas delgadas, así como la aplicación de un tiempo de plasma de oxígeno al menos de 10 min. para la correcta eliminación del patrón polimérico de las muestras. En síntesis posteriores se ensayarán tiempos de plasma superiores a este, a fin de comprobar si dan lugar a un mayor grado de eliminación del patrón polimérico sin modificar las características de las MNPs obtenidas en el proceso sintético, pero siempre por debajo del límite máximo de 20 min. establecido en las indicaciones del equipo empleado.

4.2.1.2. Estudio del efecto de la temperatura de mezcla

Una vez determinado que el dioxano es el disolvente selectivo más adecuado para la preparación de los sistemas de MNPs en película delgada, el siguiente análisis se centró en establecer la temperatura de mezcla ideal entre la disolución polimérica y la disolución de FAA. Se estudiaron cuatro temperaturas de mezcla diferentes, todas ellas próximas a la temperatura de ebullición del dioxano, puesto que al efectuar la mezcla a temperaturas próximas a la temperatura de cambio de estado del disolvente se favorece la reacción posterior entre los componentes⁶. Dado que la temperatura de ebullición del dioxano es de 102 °C se sintetizaron sistemas a las siguientes temperaturas de mezcla

entre las disoluciones de PS-*b*-P4VP y de FAA: 75, 80, 85, 90 y 95 °C. Al igual que en el ensayo preliminar para la elección del disolvente, en esta ocasión se volvieron a preparar disoluciones poliméricas a una concentración $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y disoluciones de FAA a concentración de $17.21 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (la razón molar entre P4VP y FAA fue 1/2.50). Después de efectuar las mezclas entre disoluciones a las temperaturas antes mencionadas, estas se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y reaccionando durante 8 h. Tras la preparación de las películas delgadas mediante espín-coating (2000 rpm durante 60 s), estas se sometieron a un vacío de 100 mbar durante 12 h, se trataron con plasma de oxígeno durante 10 min. y, finalmente, se introdujeron en un baño de ultrasonidos en cloroformo durante 30 s a fin de eliminar las posibles trazas poliméricas aún presentes. En la Figura 4.6 se muestran las imágenes de SEM de las muestras obtenidas según las diferentes temperaturas de mezcla de las disoluciones de PS-*b*-P4VP y FAA.

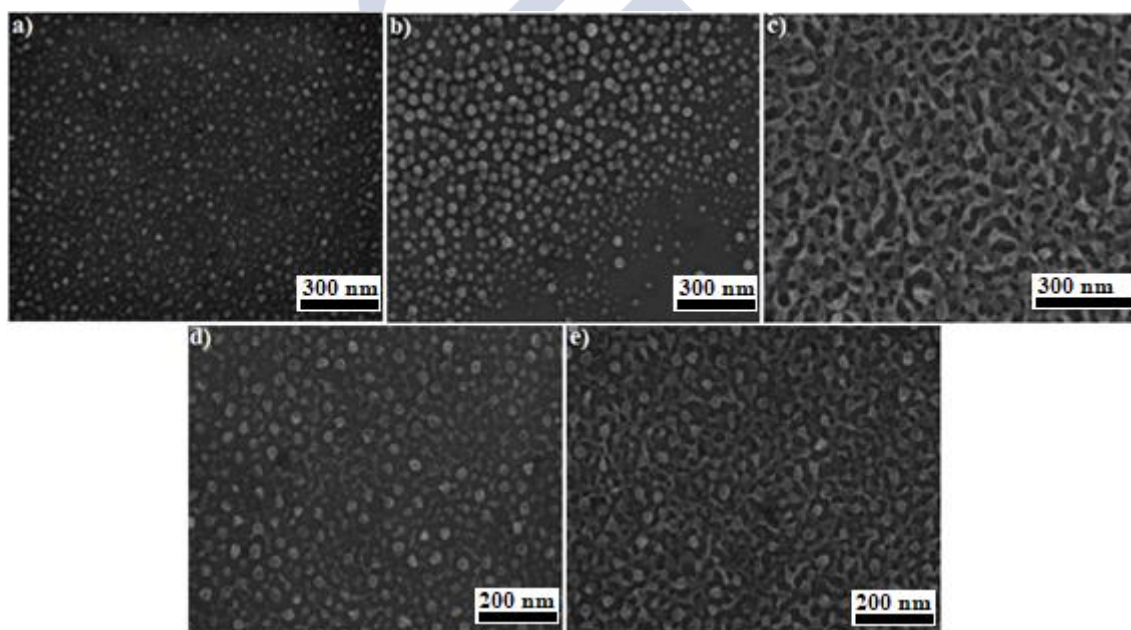


Figura 4.6: Imágenes SEM de las películas delgadas preparadas a temperaturas de mezcla de las disoluciones de PS-*b*-P4VP y FAA de a) 75, b) 80, c) 85, d) 90 y e) 95 °C.

A partir de las imágenes de SEM anteriores se puede observar que la estructura de las películas delgadas cambia sutilmente según la temperatura de mezcla de las disoluciones. A las temperaturas más altas, a partir de 85 °C, las películas delgadas presentan numerosas ramificaciones, que hacen que las MNPs se constituyan en una

especie de cadenas con numerosas unidades fusionadas y agregadas (Figuras 4.6c-e). Sin embargo, en las películas delgadas correspondientes a las temperaturas de mezcla de 75 y 80 °C (Figuras 4.6a-b) sí se pueden distinguir las diferentes MNPs de forma individual y, en algunas regiones de las muestras, con disposición cuasi-ordenada (hexagonal). Por ello, se puede concluir que una temperatura de mezcla muy próxima a la temperatura de ebullición del disolvente da lugar a fenómenos de agregación entre las MNPs, lo que perjudica la formación de patrones ordenados y homogéneos. De entre las dos muestras con los mejores resultados obtenidos, en la que se pueden observar las MNPs de forma más nítida y en una disposición más ordenada es aquella correspondiente a una temperatura de mezcla entre la disolución de FAA y la disolución polimérica de 80 °C, por lo que en las síntesis sucesivas este será el valor escogido para dicho parámetro.

Por otra parte, en varias de las muestras sintetizadas hasta el momento se puede observar que los sistemas nanoparticulados obtenidos no presentan un carácter homogéneo en toda la superficie de los sustratos, fenómeno que se observa de forma especialmente clara a niveles de magnificación inferiores a los de las imágenes mostradas. A fin de subsanar este problema, en las síntesis llevadas a continuación se modificará la atmosfera empleada para acelerar la formación de los microdominios poliméricos, sustituyendo el vacío primario por una atmósfera saturada de vapor de dioxano.

4.2.1.3. Estudio del efecto de la temperatura de reacción

El proceso de optimización de la síntesis de sistemas ordenados de MNPs de óxido de hierro en película delgada efectuado hasta el momento nos sirvió para, por una parte, determinar el uso del dioxano como disolvente y, por otra, establecer una temperatura de mezcla de 80 °C entre disoluciones de FAA y de PS-*b*-P4VP como condiciones idóneas. A continuación, se estudió el efecto de la temperatura a la que el polímero y el FAA reaccionan (durante 8 h) una vez efectuada la mezcla de las respectivas disoluciones. De este modo, se analizó la influencia del incremento de la temperatura de reacción sobre las películas delgadas resultantes hasta el mismo valor que la temperatura de mezcla antes establecida, 80 °C (en contraposición con todas las síntesis efectuadas previamente, en las que la reacción tuvo lugar a temperatura

ambiente). Por otro lado, y como se mencionó con anterioridad, también se comprobó de forma simultánea el efecto del tratamiento de las muestras obtenidas en atmósfera de dioxano como alternativa al tratamiento en vacío para acelerar la formación de los microdominios poliméricos. Así, al igual que en los dos apartados anteriores, se volvieron a preparar disoluciones poliméricas de concentración $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y disoluciones de FAA de concentración de $17.21 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, de forma que la razón molar entre P4VP y FAA fue 1/2.50. Después de efectuar las mezclas entre disoluciones a una temperatura de 80°C , estas reaccionaron durante 8 h a temperatura ambiente ó a 80°C . Posteriormente, las películas delgadas fueron preparadas mediante la técnica espín-coating bajo una velocidad de rotación de 2000 rpm durante 60 s. A continuación, las películas fueron sometidas a una atmósfera saturada de vapor de dioxano durante 96 h, siendo finalmente tratadas con plasma de oxígeno durante 10 min. y sonicadas en cloroformo durante 30 s. En la Figura 4.7 se muestran las imágenes de SEM de las dos muestras obtenidas según las diferentes temperaturas de reacción ensayadas.

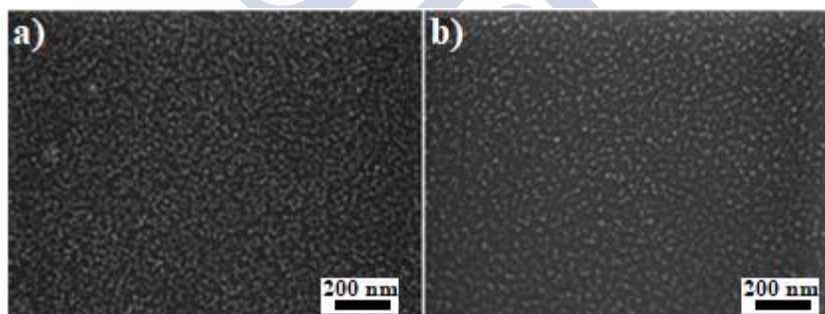


Figura 4.7: Imágenes SEM de las películas delgadas preparadas tras temperaturas de reacción de las disoluciones precursoras de a) 25°C (temperatura ambiente) y b) 80°C .

Las imágenes de SEM de las películas delgadas obtenidas no son completamente satisfactorias en ninguna de las dos pruebas efectuadas. Tanto en la muestra sintetizada a temperatura ambiente (Figura 4.7a) como en la sintetizada a 80°C (Figura 4.7b) las MNPs resultantes presentan un cierto grado de fusión y/o agregación, no observándose de forma clara un sistema ordenado de NPs. Sin embargo, este efecto es menos importante en la película delgada obtenida a una temperatura de reacción de 80°C , dónde se observan algunas regiones en las que las MNPs sí se disponen individualmente de forma nítida, sin apenas ramificaciones entre las mismas. Por ello, en los procesos sintéticos sucesivos la temperatura de reacción de las disoluciones precursoras de las

películas delgadas será de 80 °C, igual que la temperatura de mezcla entre las disoluciones de FAA y de PS-*b*-P4VP.

En cuanto a la aplicación de la atmósfera saturada de vapor de dioxano, se observa que los nanosistemas obtenidos en esta ocasión se caracterizan por un grado de homogeneidad mayor que en síntesis previas realizadas bajo atmósfera reducida, en las que se empleó el tratamiento alternativo de vacío primario de 100 mbar. Las imágenes de SEM de la muestras sometidas a vapor de dioxano (Figura 4.7) muestran unos recubrimientos de los sustratos completamente uniformes, lo cual no se observaba en las películas delgadas obtenidas en los ensayos descritos en apartados previos, las cuales habían sido sometidas a la etapa de vacío (Figuras 4.5b y 4.6b, por ejemplo). Además, y a pesar de que, por lo general, en las muestras tratadas en vacío sí existían ciertas regiones de los sustratos altamente homogéneas, estas no eran totalmente continuas, pues al observarlas a menor magnificación se podían observar diversas zonas vacías que no se hallaron en aquellas películas tratadas en atmósfera saturada de dioxano.

En resumen, los estudios preliminares efectuados hasta el momento han servido para determinar mediante pruebas específicas la idoneidad del dioxano como disolvente selectivo para preparar las disoluciones de FAA y de PS-*b*-P4VP, así como un valor de 80 °C tanto para la temperatura de mezcla de dichas disoluciones como para la temperatura de reacción. Asimismo, estos estudios previos también sirvieron para determinar que el tiempo mínimo de plasma al que se deben someter las películas delgadas para reducir el FAA y eliminar la totalidad del patrón polimérico no debe ser inferior a 10 min., siendo incluso aconsejable aumentarlo ligeramente en experimentos sucesivos; y que para acelerar la conformación de los microdominios poliméricos el tratamiento en atmósfera de dioxano da lugar a sistemas más homogéneos que el vacío primario de 100 mbar. Finalmente, también se ha observado de manera cualitativa que la razón molar 1/2.50 entre P4VP y FAA, que se empleó en todos los ensayos preliminares efectuados hasta el momento, da lugar a películas delgadas bastante saturadas de material magnético, en las que en lugar de redes ordenadas de MNPs perfectamente dispersas se observan, en muchos casos, pequeñas agregaciones de estas en forma de estructuras entrecruzadas. Por ello, y aunque en apartados posteriores se efectuará un estudio más completo de la influencia de la razón molar entre polímero y FAA, se puede concluir que para la obtención de sistemas ordenados de MNPs sin

agregación será necesario disminuir la cantidad de FAA que se ha utilizado en las síntesis efectuadas hasta el momento.

4.2.1.4. Estudio del efecto de la razón molar P4VP-FAA y del tratamiento de las películas delgadas en vacío primario o atmósfera de dioxano

En este apartado se estudiarán de forma simultánea, por una parte, cómo varían las nanoestructuras obtenidas al modificar la proporción entre polímero y FAA y, por otra, cómo afecta de forma específica a la estructura de las películas delgadas los diferentes tratamientos ya comentados para acelerar la formación de los microdominios poliméricos: atmósfera de dioxano o vacío primario de 100 mbar. En las síntesis llevadas a cabo hasta el momento se ha utilizado en todas una razón molar entre P4VP y FAA de 1/2.50, dando lugar a sistemas con una elevada densidad de MNPs en los que, incluso, se llegaban a observar problemas de fusión y/o agregación de las mismas. Por ello, se analizaron a continuación cuatro nuevas razones molares: tres de ellas inferiores (con una menor cantidad de FAA), para intentar lograr sistemas de MNPs correctamente dispersas, y una superior, para corroborar la tendencia a la agregación del material magnético al utilizar altas cantidades de precursor magnético. Así, fueron ensayadas cinco razones molares entre P4VP y FAA: 1/0.25, 1/0.50, 1/1.00, 1/2.50 y 1/4.00.

Las diferentes disoluciones precursoras fueron preparadas siguiendo el proceso habitual que ha sido descrito y optimizado en apartados previos, es decir, usando dioxano como disolvente y añadiendo las disoluciones poliméricas sobre las disoluciones ácidas gota a gota a una temperatura de mezcla de 80 °C, la misma temperatura a la que se mantenían reaccionando las mezclas durante 8 h. A continuación, las películas delgadas fueron preparadas mediante la técnica de espín-coating a 2000 rpm durante 60 s. Se prepararon varias muestras correspondientes a cada razón molar P4VP/FAA a fin de, posteriormente, estudiar de forma paralela el efecto de los diferentes post-procesados de las mismas.

En primer lugar, se tomaron dos películas delgadas de cada razón molar P4VP-FAA y, de cada par, una fue sometida a un vacío primario de 100 mbar durante 12 h, y la otra a una atmósfera saturada de vapor de dioxano durante 96 h. Estos tratamientos, como ya se ha comentado, tienen como objetivo acelerar y estabilizar la arquitectura

final del complejo polimérico en forma de microdominios sobre el sustrato. Posteriormente, estas películas delgadas fueron observadas mediante SEM sin ningún tratamiento posterior, es decir, sin reducir el FAA ni eliminar el patrón polimérico mediante plasma de oxígeno o calcinación (Figura 4.8). De esta manera, se ha pretendido observar si, efectivamente, el copolímero de bloque utilizado se disponía sobre el sustrato en forma de un recubrimiento de PS con el P4VP formando microdominios perpendiculares a la superficie y con las moléculas de FAA asociadas a estos últimos, así como el efecto de la cantidad de FAA utilizada.

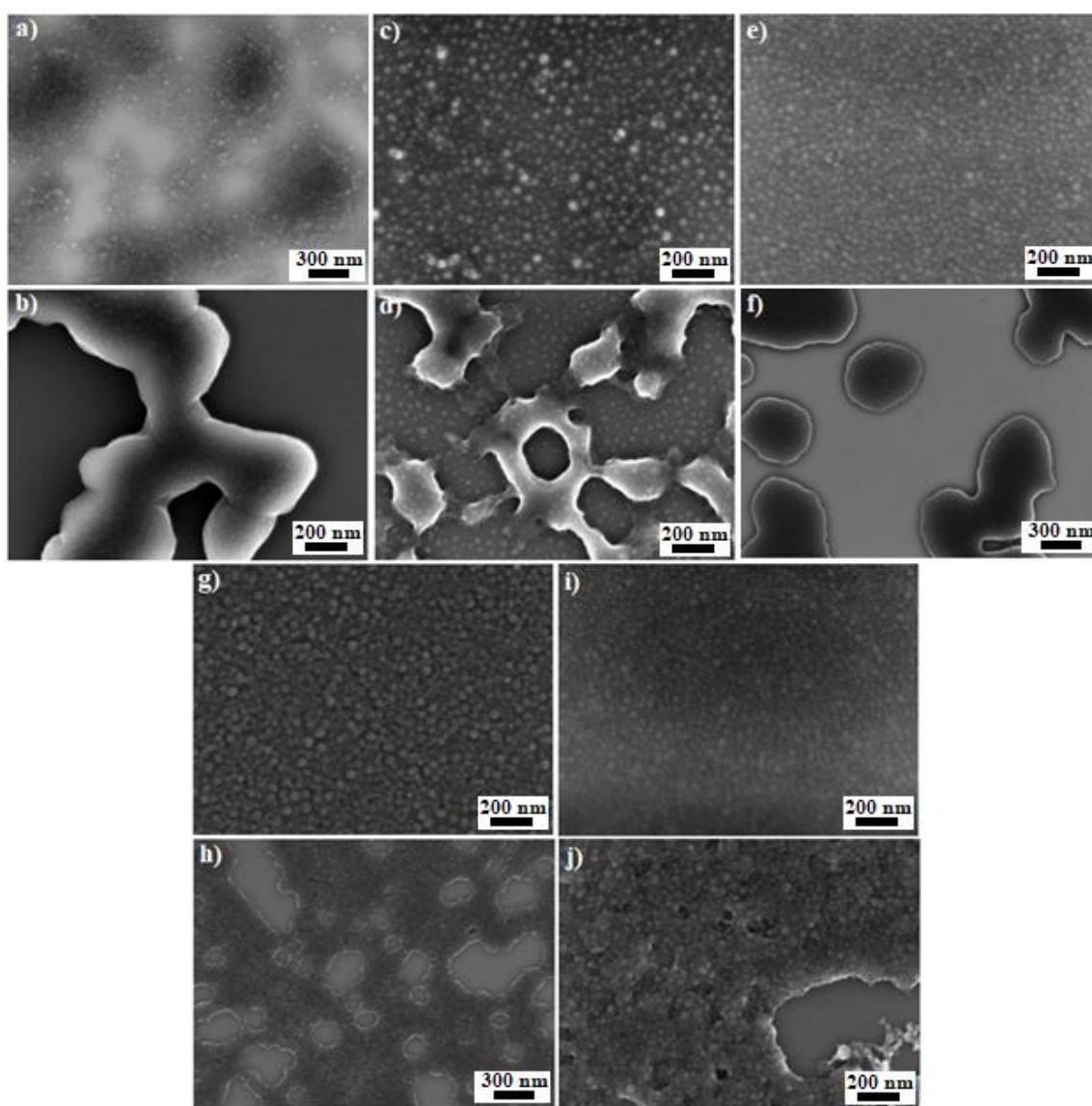


Figura 4.8: Imágenes SEM de las muestras sometidas a atmósfera de dioxano, sin tratamiento posterior, a razón molar P4VP/FAA de: a) 1/0.25, c) 1/0.50, e) 1/1.00, g) 1/2.50 e i) 1/4.00; y de las muestras sometidas a vacío primario de 100 mbar, sin tratamiento posterior, con razón molar P4VP/FAA de: b) 1/0.25, d) 1/0.50, f) 1/1.00, h) 1/2.50 y j) 1/4.00.

Es también importante destacar que en estas muestras, en las que no se ha aplicado ningún tipo de proceso para eliminar la parte polimérica, es sumamente difícil obtener imágenes de SEM de calidad óptima, ya que estas deben de ser realizadas de forma muy rápida, sin alcanzar los grados de enfoque y contraste ideal, debido al alto riesgo de calcinación de la parte orgánica de la película al aproximar mucho el objetivo del microscopio con el fin de lograr la mayor resolución posible. Por ello, las fotografías de los patrones poliméricos se realizan, por lo general, a un número bajo de aumentos y aún así, en muchas ocasiones, la nitidez obtenida no ha sido demasiado alta.

El problema de calcinación de la parte orgánica de las muestras bajo el haz de electrones es especialmente relevante en aquellas películas delgadas con cantidades pequeñas de FAA y, por tanto, alta proporción polimérica (Figura 4.8a-d). A pesar de esto, son varias las conclusiones que se pueden extraer: en primer lugar, resulta claro que el tratamiento de las películas en atmósfera de dioxano da lugar a patrones poliméricos mucho más homogéneos sobre la superficie del sustrato que el tratamiento en vacío primario. Esta diferencia de comportamiento se atribuye a la mayor movilidad que proporciona a las cadenas poliméricas el vapor del disolvente orgánico al ser este un disolvente altamente selectivo para los bloques de PS. Esta provoca, a su vez, un rápido ordenamiento de la película polimérica según la estructura de microdominios preferencial dadas las condiciones de preparación de la muestra. Por su parte, la movilidad que provoca en las cadenas del copolímero de bloque el vacío primario de 100 mbar es más reducida y, en consecuencia, la distribución del complejo híbrido polímero-FAA no llega a ser uniforme sobre toda la superficie del sustrato, dando lugar a las inhomogeneidades que se observan en las imágenes de SEM de estas muestras. Es necesario comentar que la estufa de vacío utilizada no permitía ensayos a presiones inferiores a la citada, y que pudiesen dar lugar a una mayor movilidad de las cadenas y, por tanto, a patrones poliméricos más homogéneos sobre los sustratos.

Por su parte, también se puede establecer una comparación entre las diferentes densidades de los microdominios de los patrones poliméricos en función de la razón molar entre P4VP y FAA, tanto en el caso de las películas delgadas tratadas en atmósfera de dioxano como en el caso de las tratadas en vacío. Nótese que dicha comparación es más compleja debido al problema comentado de la falta de claridad de las imágenes que, si bien es demasiado importante para caracterizar a grandes rasgos el grado de homogeneidad de las muestras como se hizo anteriormente, sí dificulta la

observación de los microdominios poliméricos de forma individual para estudiar su disposición y densidad. No obstante, especialmente en el caso de las muestras tratadas en una atmósfera saturada de vapor de dioxano (Figuras 4.8a, 4.8c, 4.8e, 4.8g, 4.8i), sí se pueden observar de forma suficientemente clara los microdominios de P4VP con el FAA asociado. De este modo, se comprueba que las diferentes muestras siguen el siguiente comportamiento: a medida que se aumenta la cantidad de FAA se incrementa el grado de saturación de los microdominios de P4VP con este compuesto, dando lugar a una densidad de microdominios poliméricos modificados mayor. Así, se pasa de unas muestras con baja cantidad de FAA, en las que los dominios poliméricos se observan de forma prácticamente individual, a la muestra con la cantidad de FAA más alta, en la que estos cubren la totalidad de sustrato con una densidad muy elevada. Este mismo comportamiento también se puede observar en las películas delgadas sometidas a vacío primario de 100 mbar (Figuras 4.8b, 4.8d, 4.8f, 4.8h, 4.8j), si bien en este caso las grandes regiones vacías sobre los sustratos dificultan el análisis; además, las imágenes correspondientes a las cantidades de FAA más bajas presentan un grado de nitidez especialmente reducido. Sin embargo, en las zonas de las películas con altas proporciones de FAA sí se puede observar la presencia de los microdominios de P4VP-FAA y una mayor densidad de los mismos a medida que aumenta la cantidad del compuesto organometálico utilizada.

4.2.1.5. Estudio del efecto de la razón molar P4VP-FAA y del tratamiento de las películas delgadas mediante plasma de oxígeno o calcinación

Tras analizar la conformación de los nanosistemas híbridos a diferentes razones molares en forma de película delgada, el siguiente estudio realizado consistió en analizar la influencia de los tratamientos de plasma de oxígeno y calcinación en, por una parte, la reducción del compuesto organometálico y consiguiente formación de las MNPs de óxido de hierro y, por otra, la eliminación de la matriz polimérica. Estos tratamientos se llevaron a cabo en películas delgadas con diferentes razones molares entre P4VP y FAA y tratadas alternativamente en vacío y atmósfera saturada de vapor de dioxano sintetizadas en el apartado previo.

En el primer ensayo efectuado, la reducción del FAA y la eliminación de la matriz orgánica se llevaron a cabo mediante un tratamiento con plasma de oxígeno. A

diferencia de las pruebas preliminares, dónde los tiempos de plasma implementados fueron de 5 o 10 min., en este caso el tiempo de aplicación se incrementó a 15 min. con la finalidad de aumentar la eficacia del proceso. A continuación, todas las películas delgadas se introdujeron en cloroformo dentro de un baño de ultrasonidos para asegurar la completa eliminación del patrón polimérico. Se aplicó este procedimiento a películas delgadas de las cinco razones molares estudiadas, que habían sido sometidas previamente tanto a una atmósfera saturada de vapor de dioxano durante 96 h como a un vacío primario de 100 mbar durante 12 h, respectivamente (Figura 4.9).

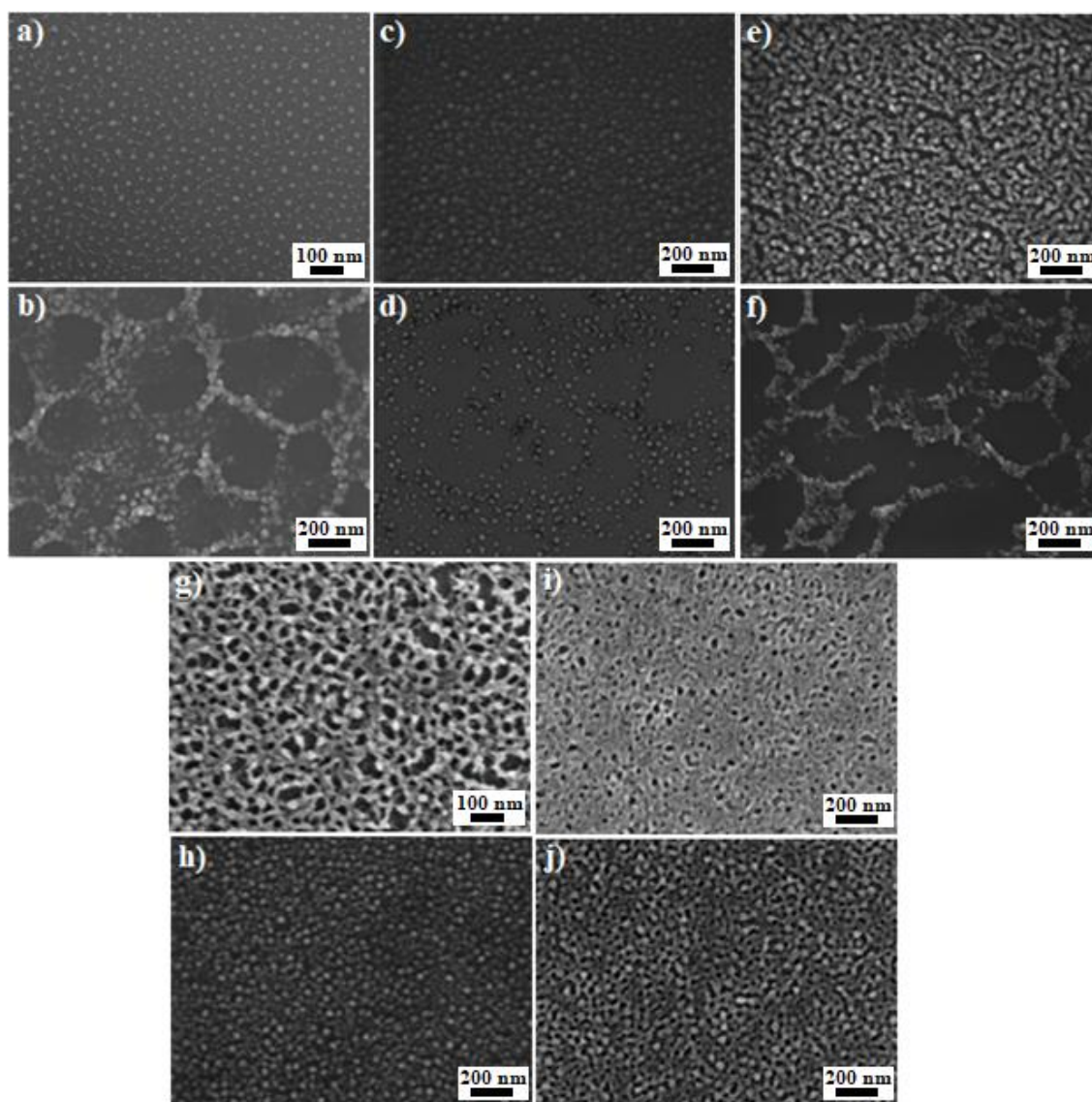


Figura 4.9: Imágenes SEM de las muestras sometidas a atmósfera de dioxano y plasma de oxígeno a razones molares P4VP/FAA de: a) 1/0.25, c) 1/0.50, e) 1/1.00, g) 1/2.50 e i) 1/4.00; y de las muestras sometidas a vacío primario de 100 mbar y plasma de oxígeno a razones molares P4VP/FAA de: b) 1/0.25, d) 1/0.50, f) 1/1.00, h) 1/2.50 e j) 1/4.00.

Observando las imágenes de SEM anteriores se confirma que el tratamiento de las películas delgadas en atmósfera de dioxano da lugar a resultados mucho mejores que el tratamiento en vacío. Tal y como era de esperar, dadas las imágenes de los patrones poliméricos tomadas con anterioridad a la aplicación del plasma de oxígeno (Figura 4.8), los sistemas de MNPs obtenidos en las muestras tratadas en vacío presentan un bajo grado de homogeneidad, con numerosas áreas vacías en la superficie de los sustratos. Este fenómeno es especialmente evidente en las películas delgadas en las que se emplearon las cantidades de precursor magnético más bajas, correspondientes a las razones molares entre P4VP y FAA de 1/0.25, 1/0.50 y 1/1.00 (Figuras 4.9b, 4.9d y 4.9f), en las que coexisten zonas del sustrato completamente cubiertas con MNPs con otras muchas en las que no hay o estas están muy dispersas. En las películas delgadas tratadas con vacío y plasma de oxígeno a razones molares 1/2.50 y 1/4.00 (Figuras 4.9h y 4.9j) puede observarse un recubrimiento ligeramente más uniforme. A pesar de esta falta de homogeneidad de los nanosistemas tratados sucesivamente con vacío y plasma de oxígeno, las zonas de los sustratos correctamente cubiertas muestran, en general, una densidad creciente de MNPs a medida que se aumenta la cantidad de FAA empleada.

Por su parte, las películas delgadas que fueron sometidas a plasma de oxígeno tras ser tratadas en atmósfera de dioxano sí muestran un aspecto completamente homogéneo. Por tanto, en estas condiciones sí se puede analizar de forma más exhaustiva el efecto de la razón molar entre P4VP y FAA en las características de los sistemas finales de MNPs obtenidos. En la imagen correspondiente a la razón molar 1/0.25 (Figura 4.9a) se observa un sistema de MNPs de densidad relativamente baja, sin ningún problema de solapamiento y/o fusión de las mismas. La baja densidad de material magnético permite aún ver perfectamente el sustrato de silicio usado como soporte. Las imágenes de las películas obtenidas a razones molares 1/0.50, 1/1.00 y 1/2.50 (Figuras 4.9c, 4.9e y 4.9g) muestran una densidad de MNPs creciente, de forma que el porcentaje del sustrato de silicio que queda a la vista va disminuyendo progresivamente. Mientras que en la muestra de razón 1/0.50 las MNPs aún se pueden observar de forma individual, si bien muy próximas unas de otras, en las muestras de razón 1/1.00 y 1/2.50 ya comienzan a darse fenómenos de fusión de las MNPs que se extienden a lo largo de toda el área del sustrato. Por su parte, en la imagen SEM de la muestra de razón molar 1/4.00 entre P4VP y FAA el material magnético ya forma una capa o tamiz poroso que recubre la práctica totalidad del soporte de silicio. Estos

resultados están en total consonancia con las imágenes de los patrones poliméricos expuestas anteriormente (Figura 4.8), en dónde se veía que el aumento de las cantidades de FAA en las disoluciones precursoras daba lugar a dominios cada vez más saturados y más próximos entre sí cuando se preparaban las películas delgadas. Por tanto, tras efectuar la reducción del compuesto organometálico para formar las MNPs estas conservan aproximadamente el grado de densidad de los microdominios.

A continuación, se analizaron las posibles modificaciones que se pueden producir cuando las películas delgadas se someten a un tratamiento alternativo al plasma de oxígeno que consiste en calcinar las películas delgadas a muy alta temperatura. En vista de los resultados anteriores, en los que se concluyó que el tratamiento previo en atmósfera de dioxano ofrece muchos mejores resultados que el vacío para la obtención de sistemas homogéneos, sólo se efectuaron ensayos de calcinación en películas delgadas que habían sido introducidas en atmósfera saturada de vapor de dioxano durante 96 h a las distintas razones molares entre P4VP y FAA. Antes calcinar las películas delgadas, estas se irradiaron con un haz de luz ultravioleta de 254 nm durante 45 min (proceso de entrecruzamiento) con el objetivo de limitar el movimiento de las cadenas poliméricas durante el calentamiento posterior. De esta forma se garantiza que el orden establecido en las películas delgadas en las etapas previas de la síntesis no se vea perturbado. Los tratamientos de calcinación ensayados se efectuaron a temperaturas de 450, 525, 600 y 1000 °C durante 120 min. (Figuras 4.10 a 4.13).

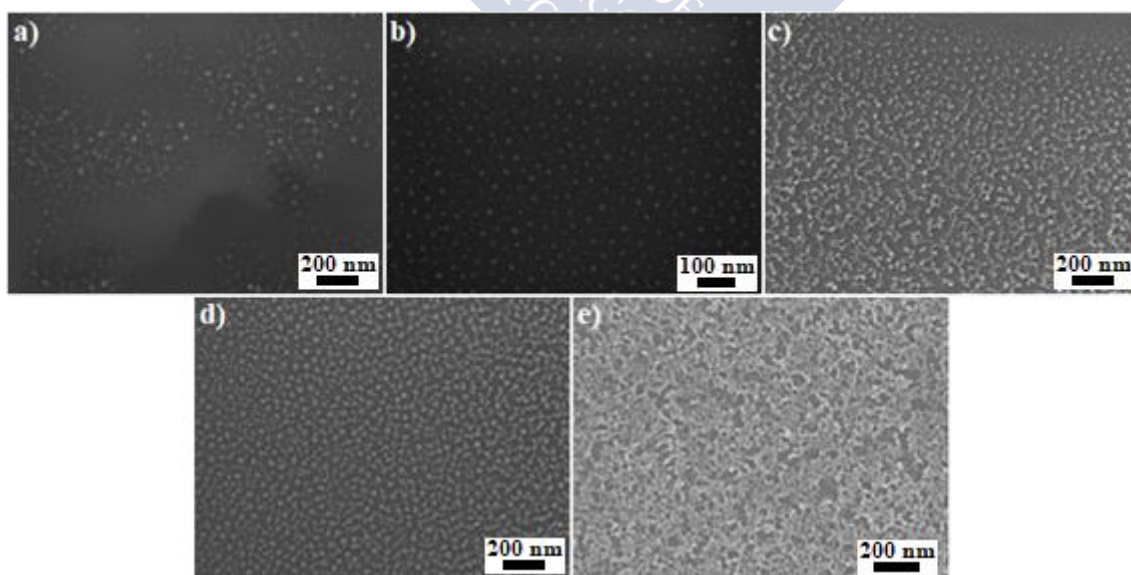


Figura 4.10: Imágenes SEM de las muestras sometidas a atmósfera de dioxano y calcinación a 450 °C a razón molar P4VP/FAA de: a) 1/0.25, b) 1/0.50, c) 1/1.00, d) 1/2.50 y e) 1/4.00.

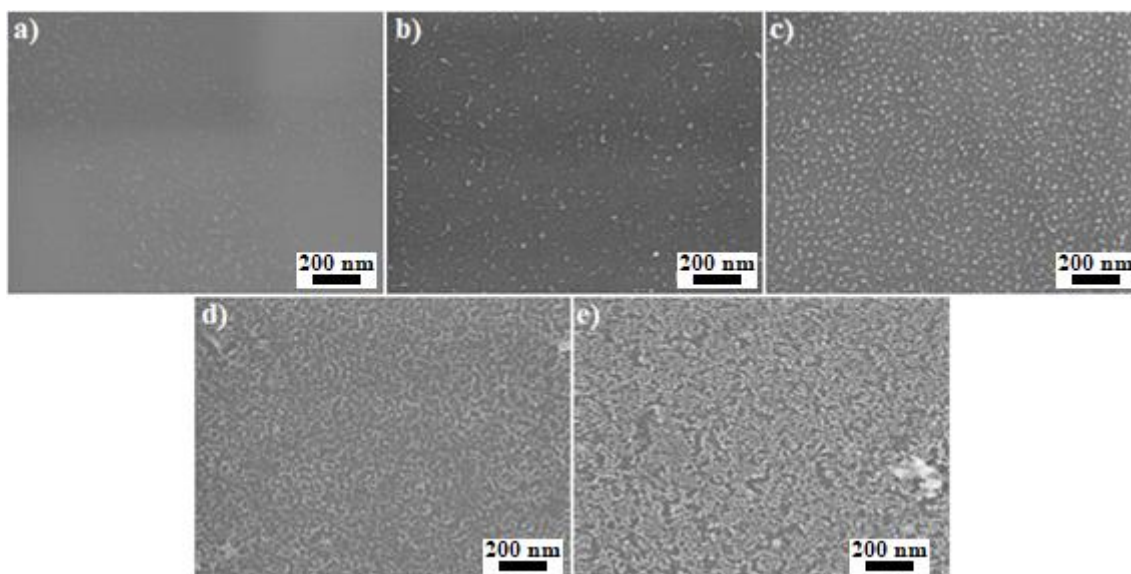


Figura 4.11: Imágenes SEM de las muestras sometidas a atmósfera de dioxano y calcinación a 525 °C a razón molar P4VP/FAA de: a) 1/0.25, b) 1/0.50, c) 1/1.00, d) 1/2.50 y e) 1/4.00.

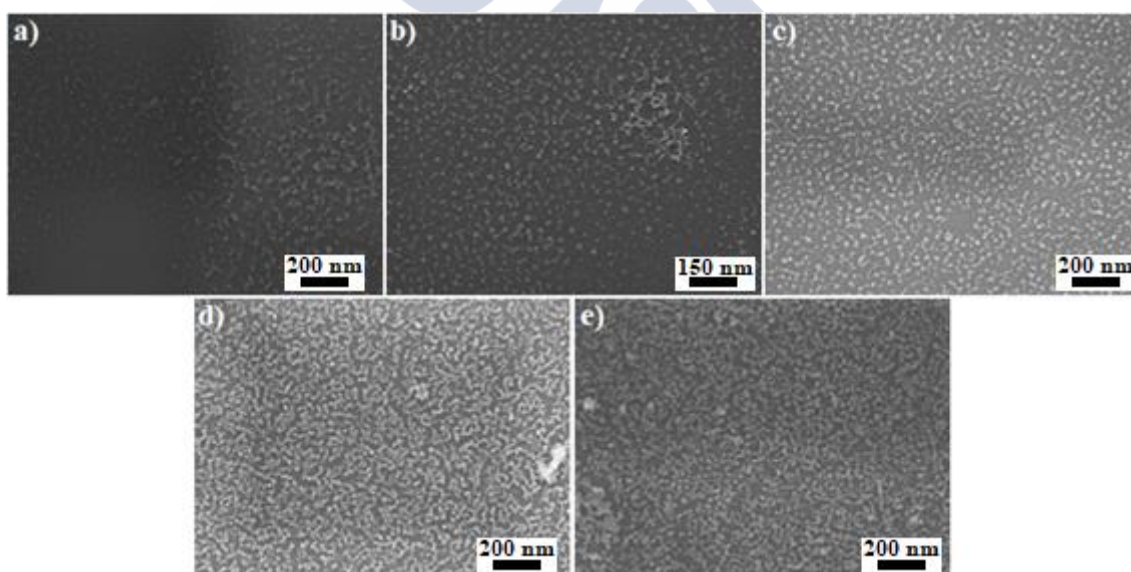


Figura 4.12: Imágenes SEM de las muestras sometidas a atmósfera de dioxano y calcinación a 600 °C a razón molar P4VP/FAA de: a) 1/0.25, b) 1/0.50, c) 1/1.00, d) 1/2.50 y e) 1/4.00.

Las diferentes temperaturas de tratamiento escogidas son todas ellas superiores a las establecidas como necesarias para la calcinación del polímero empleado en estudios termogravimétricos previos²⁰. Así, se puede observar que no hay grandes diferencias entre los sistemas de MNPs obtenidos tras aplicar temperaturas de calcinación de 450,

525 y 600 °C. A cada una de las temperaturas ensayadas, las películas delgadas sintetizadas a las diferentes razones molares entre P4VP y FAA presentan un aspecto altamente homogéneo exceptuando las correspondientes a la menor cantidad de precursor magnético, en las que la densidad superficial de MNPs es bastante reducida lo cual da lugar a que en algunas muestras haya pequeñas regiones de los sustratos sin material magnético. La evolución de las películas delgadas a medida que se incrementa la cantidad de FAA en las disoluciones precursoras es la esperada, aumentando progresivamente la presencia de MNPs en los sustratos hasta que comienzan a agregarse a las razones molares más altas. Analizando las muestras en función de la temperatura de calcinación a la que fueron sometidas se observa, en primer lugar, que en aquellas calcinadas a 450 °C los fenómenos de agregación de las MNPs sólo son completamente evidentes en las películas delgadas con mayor cantidad de precursor magnético (razón molar 1/4.00 entre P4VP y FAA, Figura 4.10e), en las que el material magnético aparece completamente fusionado y recubre un alto porcentaje del sustrato de silicio. En los nanosistemas calcinados a esta temperatura de 450 °C a razones molares 1/0.25 y 1/0.50 (Figuras 4.10a-b) se observa una densidad superficial de MNPs creciente a medida que aumenta la cantidad de FAA utilizada, pero dispuestas de forma individual y con tan solo pequeñas ramificaciones entre ellas. En los sistemas a razones molares 1/1.00 y 1/2.50 (Figuras 4.10c-d), en cambio, estas ramificaciones ya son más importantes, denotando pequeños fenómenos de fusión entre las MNPs. Por su parte, las películas delgadas calcinadas a 525 y a 600 °C deparan unos resultados prácticamente idénticos entre sí, aunque ligeramente diferentes a los de las calcinadas a 450 °C. La principal diferencia es que en estas la agregación de las MNPs alcanza un grado muy elevado ya a la razón molar 1/2.50 (Figuras 4.11d y 4.12d), siendo incluso no despreciable en las muestras de razones molares más bajas (Figuras 4.11a-c y 4.12a-c), dónde se observa que las MNPs presentan unas ramificaciones más grandes debidas presumiblemente a pequeños fenómenos de agregación.

Si comparamos estas imágenes de las películas delgadas sometidas a calcinación a diferentes temperaturas con las tratadas con plasma de oxígeno estudiadas anteriormente (Figura 4.9) se observa un comportamiento similar, aunque presentan ciertas diferencias. Así, por ejemplo, en las muestras con mayor cantidad de FAA a las que se les ha aplicado el plasma de oxígeno, las MNPs se disponen formando un tamiz que apenas deja ver un porcentaje mínimo del sustrato de silicio, mientras que en las

muestras calcinadas la densidad superficial de MNPs, aunque elevada, no recubre el soporte en su totalidad. Esta tendencia se cumple, por lo general, en todas las películas delgadas a las distintas razones molares entre P4VP y FAA ensayadas. Otra diferencia, ya comentada previamente, estriba en las pequeñas ramificaciones que se observan entre las MNPs que constituyen los sistemas calcinados (especialmente a 525 y 600 °C), incluso en las muestras con bajas cantidades de FAA, fenómeno que en los nanosistemas tratados con plasma de oxígeno sucede en menor medida, y que se puede atribuir a la fusión y agregación de grupos muy reducidos de MNPs.

Por su parte, también se efectuaron ensayos de calcinación de las películas delgadas a 1000 °C, como se comentó previamente. Sin embargo, esta temperatura es demasiado elevada pues destruye completamente el orden de los sistemas e, incluso, causa daños estructurales visibles en los sustratos de silicio (Figura 4.13)

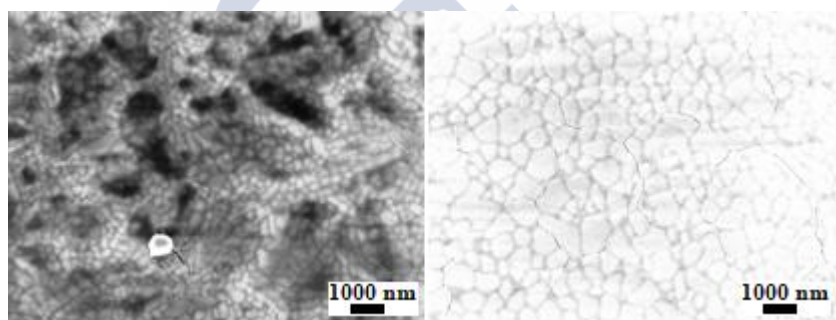


Figura 4.13: Imágenes SEM de muestras dañadas tras ser calcinadas a 1000 °C.

En resumen, en los dos últimos apartados se analizaron la influencia de tres variables en el proceso de síntesis de los sistemas de MNPs: la razón molar entre P4VP y FAA, la diferencia entre tratar las muestras en vacío primario de 100 mbar o en atmósfera saturada de vapor de dioxano, a fin de acelerar la conformación de la arquitectura final de las películas delgadas, y la diferencia entre aplicar plasma de oxígeno o un proceso de calcinación a diferentes temperaturas a las muestras, para así reducir el FAA y eliminar la matriz polimérica. Se concluyó, en primer lugar, la idoneidad del tratamiento en atmósfera de dioxano por encima del tratamiento en vacío, puesto que de esta forma se lograron sistemas con un grado mucho más alto de homogeneidad. Las diferencias entre las muestras calcinadas y las muestras irradiadas con plasma, por su parte, fueron menos claras, siendo la principal el grado de agregación de las MNPs obtenidas. Por lo general, las películas tratadas a alta

temperatura presentan menos problemas de agregación global; sin embargo, incluso en los sistemas con densidad superficial de MNPs muy baja, estas presentan pequeñas ramificaciones que dan pie a pensar en fenómenos de fusión de pequeños grupos de MNPs. Este problema se observa de forma ligeramente más clara en las muestras tratadas a 525 y 600 °C que en las tratadas a 450 °C, mostrándose esta última como la temperatura óptima de calcinación, mientras que en las películas delgadas calcinadas a 1000 °C se pierde completamente el orden de los sistemas e, incluso, se rompen los sustratos de silicio debido a la elevada temperatura. Por todo ello, se concluye que el proceso de reducción del precursor organometálico es más eficiente bajo la irradiación de plasma que bajo la acción de altas temperaturas, si bien en este caso se trata de una diferencia mucho más sutil. Por último, las razones molares entre P4VP y FAA ensayadas (1/0.25, 1/0.50, 1/1.00, 1/2.50 y 1/4.00) dieron lugar a sistemas con densidad superficial de MNPs creciente a medida que se aumentaba la cantidad de FAA en las disoluciones precursoras, de forma que solo en las películas delgadas con razones 1/0.25, 1/0.50 y, en menor medida 1/1.00, las MNPs se observan de forma individual sin fenómenos de agregación importantes entre las mismas.

4.2.2. Caracterización estructural de las películas delgadas

Tras la optimización del proceso de síntesis de sistemas ordenados de MNPs en película delgada, se procedió a continuación a la caracterización estructural de dichos nanosistemas llevada a cabo mediante dispersión y difracción de rayos X. La dispersión de rayos X, basada en la discriminación de las energías emitidas por una muestra al ser irradiada mediante rayos X, permite realizar un análisis elemental de la misma, dado que dichas energías están asociadas a las transiciones orbitales características de cada elemento²¹. Por su parte, la difracción de rayos X se basa en el estudio de las direcciones de escisión de un haz de rayos X cuando este atraviesa un sistema cristalino²². El patrón de difracción que se genera puede ser interpretado mediante la ley de Bragg²³, proporcionando información sobre la estructura cristalina de los sistemas estudiados.

Las películas delgadas que se analizaron mediante dispersión de rayos X fueron dos muestras representativas de aquellas que presentaban un patrón de MNPs con mayor grado de orden y menores problemas de agregación. Así, se escogieron la

película delgada de razón de 1/0.25 entre P4VP y FAA tratada sucesivamente en atmósfera de dioxano y plasma de oxígeno y, por otra parte, la de razón molar 1/0.50 tratada en atmósfera de dioxano y calcinada a 450 °C (Figuras 4.14a-b). A mayores, y en previsión de que la cantidad de MNPs en estas dos muestras pudiese ser demasiado baja para ser detectada correctamente mediante esta técnica, también se analizó una muestra con razón molar 1/4.00 tratada en atmósfera de dioxano y plasma de oxígeno, en cuya imagen de SEM se puede observar que la cantidad de material magnético es abundante, recubriendo todo el sustrato de silicio (Figura 4.14c).

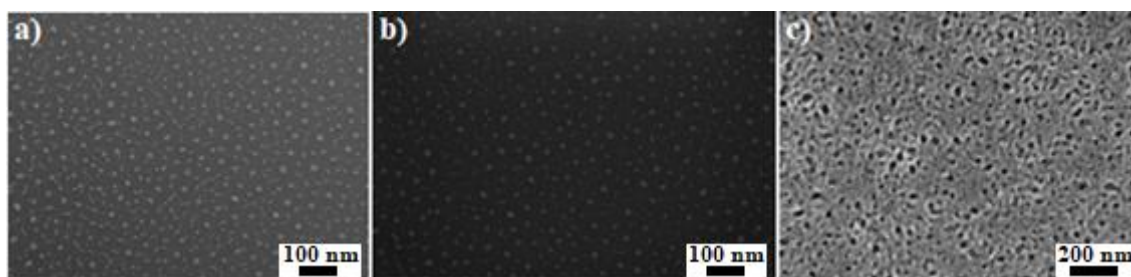


Figura 4.14: Imágenes SEM de las películas delgadas analizadas mediante dispersión de rayos X; a) razón 1/0.25 irradiada con plasma de oxígeno, b) razón 1/0.50 calcinada a 450 °C y c) razón 1/4.00 irradiada con plasma de oxígeno.

Uno de los factores clave en el estudio de muestras mediante dispersión de rayos X es el voltaje de operación del equipo²¹. Cuanto mayor sea este voltaje mayor será la “profundidad” del análisis elemental, es decir, se estudiará la composición de un porcentaje más grande del espesor total de las películas delgadas desde su superficie libre. Por tanto, en el caso de que las películas delgadas tengan un espesor muy reducido, se puede presentar el problema de que un alto porcentaje del soporte sea incluido en la medida, llegando incluso la señal del silicio a encubrir la señal de los demás elementos, de forma que el análisis elemental no proporcionase información alguna o que los resultados no fuesen altamente representativos de la composición del recubrimiento. Así, en este contexto la dispersión de rayos X supone fundamentalmente un estudio cualitativo con el que se pretende comprobar la presencia de oxígeno e hierro en las muestras, elementos constituyentes de las MNPs de óxido de hierro. El voltaje típico de operación de los equipos para la realización de los ensayos de dispersión de rayos se encuentra en el rango 20-25 kV, pero se constató que los espectros de las muestras analizadas sólo mostraban presencia de silicio bajo estas condiciones, lo cual

era indicativo de una penetración excesiva en las muestras y/o de un espesor muy reducido de las mismas (magnitud que será estudiada posteriormente, en el siguiente apartado). Por ello, se redujo el voltaje de operación a 10 kV. Este supone el valor mínimo recomendado dado que, en caso de reducirlo más, muchas de las transiciones electrónicas que generan los rayos X no se inducirían, no obteniéndose la información sobre los elementos que conforman las muestras. Los espectros de dispersión de rayos X de las muestras estudiadas se muestran en la Figura 4.15.

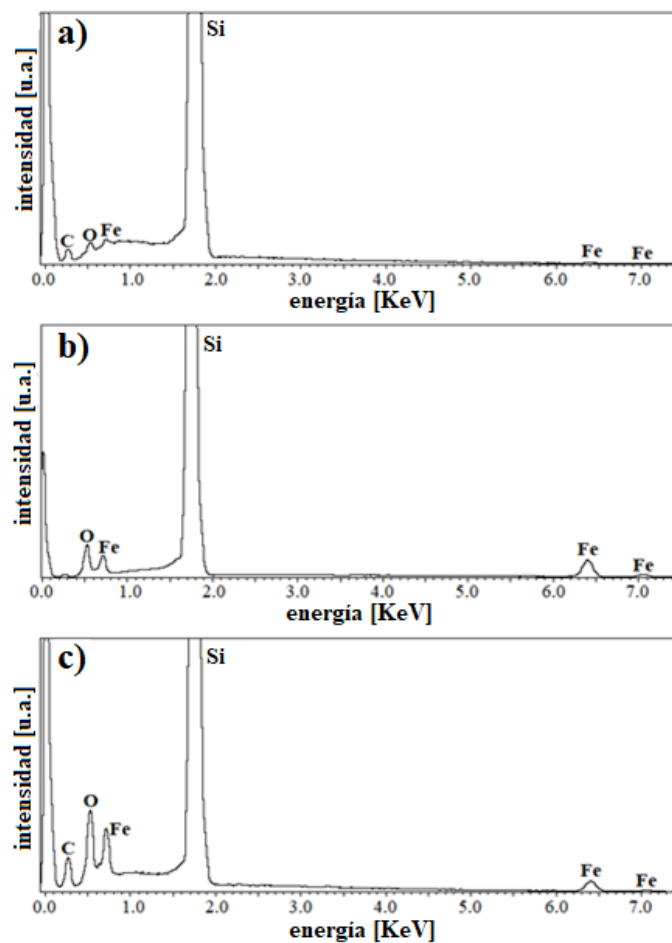


Figura 4.15: Espectros de dispersión de rayos X de las películas delgadas a: a) razón molar 1/0.25 tratada en atmósfera de dioxano e irradiada con plasma de oxígeno; b) razón molar 1/0.50 tratada en atmósfera de dioxano y calcinada a 450 °C; y c) razón molar 1/4.00 tratada en atmósfera de dioxano e irradiada con plasma de oxígeno.

Además, el equipo de dispersión de rayos X utilizado proporciona automáticamente los porcentajes en peso en los que están presentes los diferentes

elementos detectados en los espectros de dispersión. Los valores de dichos porcentajes en las tres muestras estudiadas se recogen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Presencia porcentual de los diferentes elementos detectados en las muestras analizadas mediante dispersión de rayos X.

	Muestra razón 1/0.25 plasma O ₂	Muestra razón 1/0.50 calcínación 450 °C	Muestra razón 1/4.00 plasma O ₂
% Fe	1.71	9.28	13.33
% O	0.75	4.48	6.02
% C	6.18	-	8.86
% Si	91.36	86.24	71.79

Se puede observar que en los diferentes espectros de dispersión de rayos X efectuados, a pesar de haber reducido el voltaje de operación del equipo al valor mínimo recomendado (10 kV), el pico correspondiente al silicio es, con mucha diferencia, el más alto de todos los detectados. Como ya se ha comentado previamente, esto se atribuye al reducido espesor de las películas delgadas sintetizadas. A pesar de ello, los datos obtenidos sirven para efectuar un análisis cualitativo de las muestras estudiadas. Así, por ejemplo, vemos que, como era de esperar, en todos los espectros aparecen los picos correspondientes al hierro y al oxígeno, elementos constitutivos de las MNPs de óxido de hierro que se pretenden obtener. En lo referente a los porcentajes medidos de estos dos elementos se comprueba que estos siguen una cierta tendencia. Así, la película delgada con razón molar 1/4.00 entre P4VP y FAA, es decir, aquella en la que se empleó una mayor cantidad de precursor magnético, es la que muestra una mayor presencia de hierro y oxígeno. Las cantidades de los dos elementos que forman el óxido de hierro decaen sucesivamente para las razones molares 1/0.50 y 1/0.25, comportamiento esperado dadas las cantidades de compuesto organometálico empleadas en la síntesis de cada una de ellas. Por último, también hay que destacar la detección de carbono en los análisis elementales de dos de las tres muestras estudiadas. La presencia de este elemento puede atribuirse a una incompleta eliminación del patrón polimérico de PS-*b*-P4VP de la superficie de los sustratos. Las dos películas delgadas analizadas

tratadas en plasma de oxígeno son las que presentan carbono en su análisis elemental, mientras que en la calcinada a 450 °C no hay trazas de este elemento. Esta diferencia nos permite deducir que, de cara a la total eliminación de la parte orgánica de las películas delgadas híbridas, la calcinación a alta temperatura ofrece mayores garantías que la irradiación con plasma de oxígeno seguida de la sonicación en cloroformo. Nótese, de todas formas, que las cantidades de carbono detectadas en las muestras irradiadas con plasma no son elevadas y, además, las imágenes de SEM de las mismas se observan nítidamente, sin trazas aparentes de material polimérico.

Las razones entre los porcentajes en peso de hierro y oxígeno medidos en las tres muestras estudiadas mediante dispersión de rayos X sirven para obtener una primera idea de la estructura que adopta el óxido de hierro constituyente de las MNPs sintetizadas. Así, calculando los porcentajes atómicos correspondientes a dichos porcentajes en peso, para lo cual solo hay que considerar la masa atómica de cada uno de los elementos en cuestión, se observa que en todos los casos el porcentaje atómico del oxígeno es aproximadamente 1.50 veces el porcentaje atómico del hierro (Tabla 4.2). Esta razón es característica de dos de las formas de óxido de hierro más comunes, la hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), ambas consistentes en moléculas con tres átomos de oxígeno y dos de hierro. Por tanto, el análisis composicional de las películas delgadas mediante dispersión de rayos X permitió determinar la correcta formación de MNPs de óxido de hierro, sirviendo además para establecer que la forma de este, que se determinará de forma específica a continuación, es una de las basadas en moléculas del tipo Fe_2O_3 , presumiblemente hematita o maghemita.

Tabla 4.2: Porcentajes atómicos de Fe y O en las muestras analizadas mediante dispersión de rayos X, razón entre los mismos y composición estimada de las MNPs.

	% át. Fe	% át. O	%O/%Fe	Estequiometría
Muestra razón 1/0.25 plasma O₂	0.79	1.21	1.53	Fe _{1.98} O _{3.02}
Muestra razón 1/0.50 calcinación 450 °C	4.71	7.94	1.68	Fe _{1.86} O _{3.14}
Muestra razón 1/4.00 plasma O₂	6.09	9.61	1.57	Fe _{1.94} O _{3.06}

Por otra parte, se efectuaron medidas de difracción de rayos X para la determinación específica de la estructura cristalina de las MNPs en las películas delgadas, en particular, en muestras similares a las caracterizadas en el análisis elemental, obteniéndose los difractogramas que se muestran en la Figura 4.16.

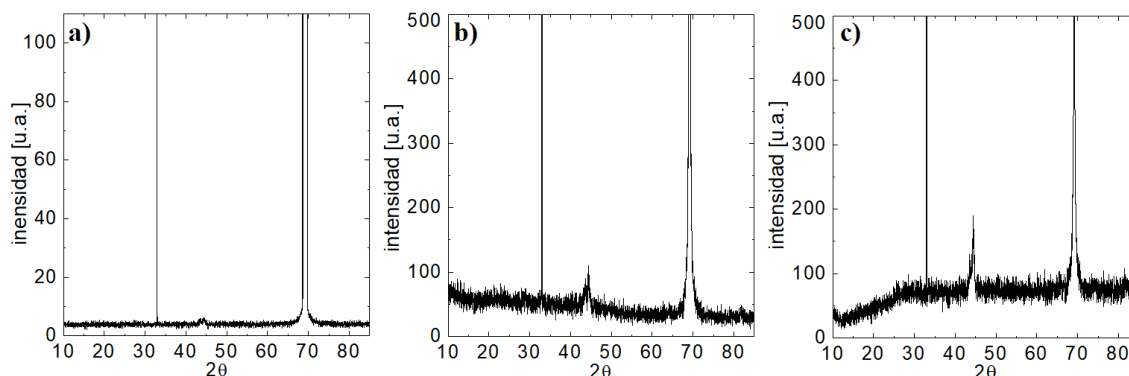


Figura 4.16: Espectros de difracción de rayos X de las películas delgadas: a) razón 1/0.25 irradiada con plasma de oxígeno, b) razón 1/0.50 calcinada a 450 °C y c) razón 1/4.00 irradiada con plasma de oxígeno.

Los espectros de difracción de rayos X de las muestras analizadas mediante esta técnica presentaron un aspecto muy similar entre ellos, con dos picos muy destacados a ángulos aproximados de 33° y 69°, y un tercero de menor altura situado a un ángulo de aproximadamente 43°. La posición de estos picos corresponden, de forma prácticamente exacta, con el espectro de difracción correspondiente al sustrato de silicio²⁴, con dos picos mayores en las posiciones 33.0° y 69.1°, y dos picos menores, muy próximos entre sí, en las posiciones 43.5° y 44.1°. Por tanto, se concluye que la cantidad de material magnético depositado en las películas delgadas que se analizaron no es lo suficientemente elevada como para obtener una buena señal de difracción de rayos X, de forma que toda la información que se obtiene es referente a los soportes utilizados y no a los recubrimientos.

De cara a obtener muestras con la suficiente cantidad de material magnético para que la estructura cristalina de este pueda ser estudiada mediante difracción de rayos X, se prepararon una serie de películas delgadas de mayor grosor sometidas a idénticas condiciones de procesamiento pero obtenidas mediante deposiciones sucesivas por espín-coating (espín-coating múltiple, cuatro deposiciones para cada muestra). Así, se sintetizaron dos películas delgadas de razones molares P4VP/FAA de 1/0.25 y 1/4.00,

respectivamente, tratadas en atmósfera saturada de vapor de dioxano y plasma de oxígeno, y otra de razón molar 1/0.50 tratada en atmósfera de dioxano y calcinada a 450 °C durante 2 h. Los espectros de difracción de rayos X de las muestras se muestran en la Figura 4.17.

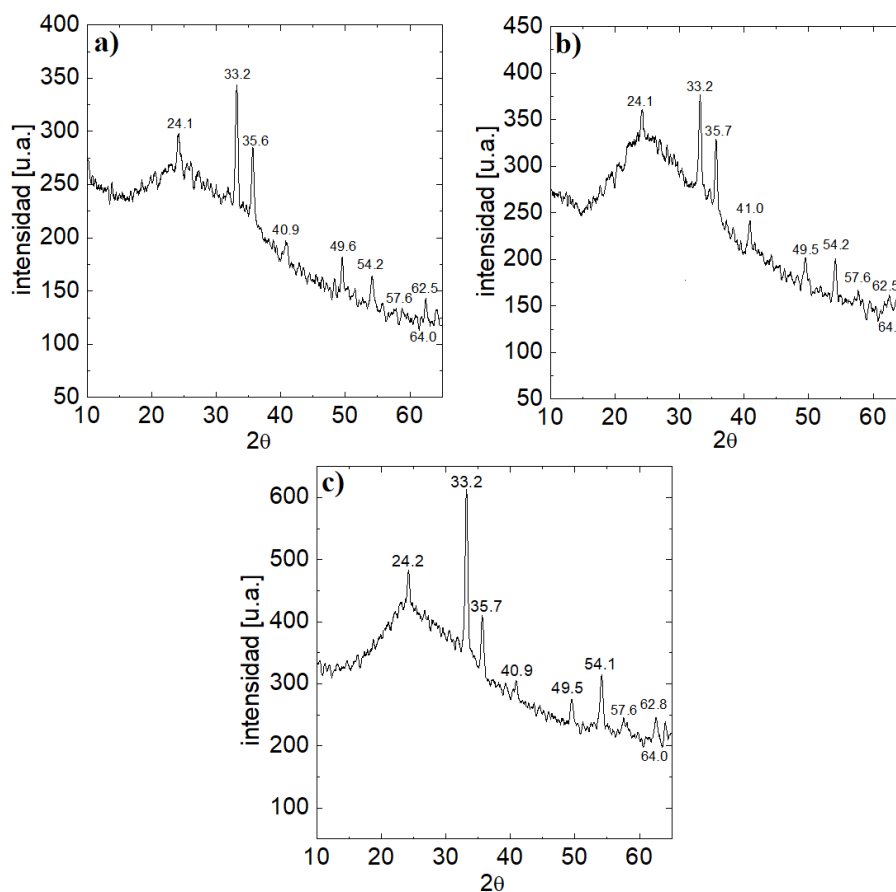


Figura 4.17: Espectros de difracción de rayos X de las películas delgadas preparadas mediante espín-coating múltiple: a) razón 1/0.25 irradiada con plasma de oxígeno, b) razón 1/0.50 calcinada a 450 °C y c) razón 1/4.00 irradiada con plasma de oxígeno.

Al igual que antes, las muestras estudiadas presentaron unos patrones de difracción prácticamente idénticos, si bien en esta ocasión el número de picos es mucho mayor. Es necesario indicar que en el análisis efectuado en este caso el intervalo angular estudiado fue entre 10° hasta 65°, de forma que el pico debido al sustrato de silicio situado en 69° quedó fuera de rango. Por su parte, los pequeños picos debidos al soporte en 43.5° y 44.1° desaparecen, manteniéndose el situado a 33.0°. Las posiciones aproximadas de los nueve picos de difracción obtenidos en cada una de las tres películas delgadas preparadas mediante la técnica de espín-coating múltiple fueron,

aproximadamente: 24.1°, 33.2°, 35.7°, 40.9°, 49.5°, 54.2°, 57.6°, 62.5° y 64.0°. Comparando los picos de difracción obtenidos con los de las tres formas principales que puede adoptar los óxidos de hierro²⁵; hematita (α -Fe₂O₃), maghemita (γ -Fe₂O₃) y magnetita (Fe₃O₄) (Figura 4.18), se puede observar claramente que los picos de difracción de las películas delgadas sintetizadas se corresponden de forma muy aproximada con los picos de difracción reportados para la hematita²⁶.

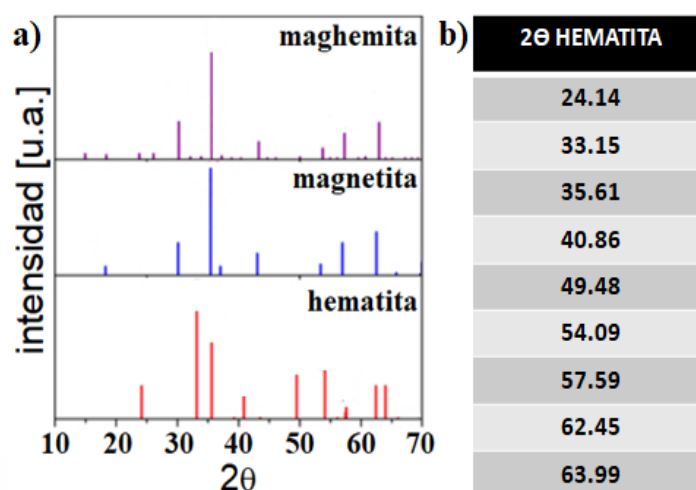


Figura 4.18: a) Posiciones típicas de los picos de difracción asociados a los planos cristalinos en los espectros de difracción de rayos X de diferentes óxidos de hierro: hematita, maghemita y magnetita. b) Valores numéricos de las posiciones de los picos de difracción del óxido de hierro en forma de hematita.

En resumen, los ensayos de dispersión y difracción de rayos X han permitido, por una parte, confirmar la presencia de hierro y oxígeno en las películas delgadas y, por otra, averiguar que el óxido de hierro que estos dos elementos conforman toma la estructura cristalina α -Fe₂O₃ (hematita). En ambos estudios, la reducida cantidad de material magnético depositada sobre los sustratos complicó los análisis. Así, en los análisis elementales de las películas delgadas mediante dispersión de rayos X fue detectado un elevado porcentaje del silicio constituyente de los sustratos. Por su parte, en los estudios de difracción de rayos X se tuvieron que preparar películas delgadas de mayor grosor mediante la técnica de sucesivas deposiciones por espín-coating, dado que en un principio la baja cantidad de MNPs en las películas delgadas obtenidas por la deposición simple provocaba que en los espectros de difracción de rayos X sólo apareciesen los picos asociados a los sustratos de silicio.

4.2.3. Estudio del espesor y el magnetismo de las películas delgadas

La medida del espesor de las películas delgadas se llevó a cabo mediante reflectometría de rayos X, una técnica de elevada precisión pero que sólo es aplicable en sistemas con un alto grado de uniformidad²⁷. Este método consiste en hacer incidir de forma rasante un haz monocromático de rayos X sobre una superficie plana para, a continuación, evaluar la intensidad del haz reflejado en la dirección especular. Existe un ángulo crítico, generalmente inferior a 0.3° , por debajo del cual tiene lugar el fenómeno de reflexión total. Al superar ese ángulo crítico de incidencia el haz de rayos X comienza a penetrar en la muestra y el patrón de franjas de interferencia generado puede ser interpretado según la ecuación de Fresnel²⁸, proporcionando información sobre el espesor y la rugosidad de las diferentes capas que forman la muestra²⁹. Los estudios para determinar los espesores de películas delgadas de una sola capa se suelen llevar a cabo con ángulos de incidencia desde 0.1° hasta $1-2^\circ$.

Así, se analizaron mediante reflectometría de rayos X las películas delgadas caracterizadas mediante dispersión y difracción de rayos X, esto es, las películas con razones molares entre P4VP y FAA de 1/0.25 y 1/4.00 tratadas sucesivamente en atmósfera saturada de vapor de dioxano y plasma de oxígeno y, por otra parte, la película delgada de razón molar 1/0.50 tratada en atmósfera de dioxano y calcinada a 450°C durante 120 min., todas ellas preparadas mediante la técnica de espín-coating bajo condiciones de revolución de 2000 rpm durante 1 min. Las curvas de reflectometría de rayos X de cada una de las películas delgadas, obtenidas aplicando ángulos de incidencia del haz de rayos X desde 0.15 hasta 0.85° , se muestran en la Figura 4.19.

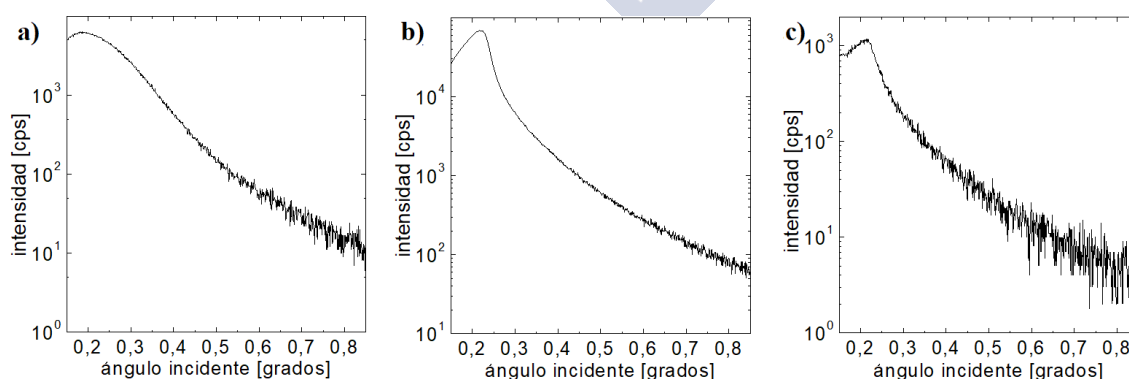


Figura 4.19: Curvas de reflectometría de rayos X de las películas delgadas preparadas mediante la técnica de espín-coating: a) razón 1/0.25 irradiada con plasma de oxígeno, b) razón 1/0.50 calcinada a 450°C y c) razón 1/4.00 irradiada con plasma de oxígeno.

El equipo de reflectometría de rayos X utilizado interpreta automáticamente el patrón de interferencia de las curvas y calcula la magnitud del espesor de la monocapa crecida sobre los soportes de silicio. Los valores de dichos espesores en las tres muestras estudiadas se recogen en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Espesores de las tres películas delgadas analizadas, obtenidos mediante reflectometría de rayos X.

	Muestra razón 1/0.25 plasma O ₂	Muestra razón 1/0.50 calcínación 450 °C	Muestra razón 1/4.00 plasma O ₂
Espesor[nm]	9.18 ± 0.73	7.17 ± 0.28	17.2 ± 1.5

Tal y como era de esperar, los valores de los espesores de las películas delgadas preparadas mediante la técnica de espín-coating por deposición simple son bastante reducidos, si bien entran dentro del rango que era presumible dadas las condiciones bajo las que fueron sintetizadas³⁰, y son coherentes con el hecho de que sus difractogramas de rayos X sólo presentasen los picos correspondientes a los soportes de silicio sobre los que estaban preparadas³¹.

Adicionalmente, y a modo de prueba, se efectuaron mediciones de espesor de las tres películas delgadas preparadas mediante la técnica de espín-coating múltiple, aquellas que se utilizaron para determinar la estructura cristalina de las MNPs sintetizadas mediante difracción de rayos X. Como se mencionó con anterioridad, la reflectometría de rayos X solo es una técnica válida para determinar el espesor en el caso de muestras muy homogéneas y con una superficie libre altamente uniforme, condición que, en principio, parecen no cumplir completamente las películas sintetizadas mediante múltiples deposiciones por espín-coating debido, probablemente, a la necesidad de optimizar de forma más precisa el procedimiento de obtención. Por ello, el grosor de estas tres películas delgadas fue medido de forma alternativa mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM)^{32,33} en modo no contacto, obteniéndose las imágenes y los histogramas con las distribuciones estadísticas de espesores que se presentan en las Figuras 4.20, 4.21 y 4.22. Las medidas de AFM permitieron, además de establecer el espesor de las muestras, determinar las

características morfológicas y los grados de agregación y homogeneidad de los sistemas de MNPs sintetizados mediante la técnica de espín-coating múltiple, pudiendo así comparar estos con los previamente sintetizados a partir de disoluciones idénticas y con igual tratamiento posterior mediante espín-coating sencillo.

Así, se comprobó que las películas delgadas preparadas presentan una superficie libre muy irregular, al tiempo que el espesor promedio de las mismas es notablemente superior al de las muestras preparadas mediante deposición simple por espín-coating. En las películas delgadas se midieron espesores puntuales superiores a 100 nm, si bien los valores promedios fueron de 51.0, 52.3 y 65.1 nm, respectivamente (Figuras 4.20b, 4.21b y 4.22b). Aunque los valores de espesor promedio medidos fueron muy similares, sus pequeñas diferencias guardan cierta lógica con la composición de las disoluciones precursoras empleadas, siendo la película delgada preparada con una mayor cantidad de precursor magnético (razón molar P4VP-FAA 1/4.00) la que dio lugar a un sistema más denso y con un espesor ligeramente superior al de las demás muestras.

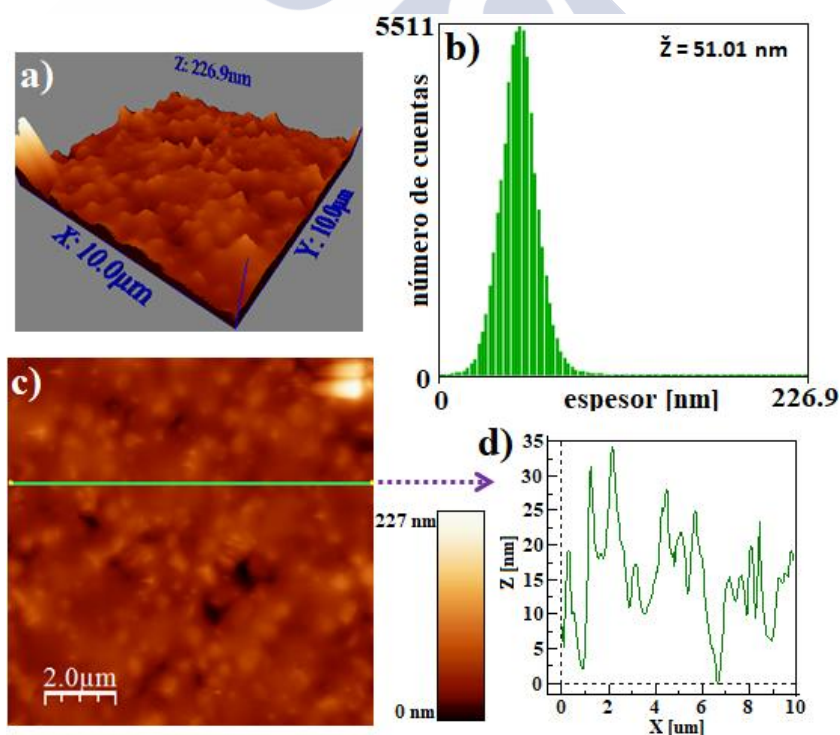


Figura 4.20: Película delgada preparada mediante espín-coating múltiple obtenida a una razón 1/0.25 irradiada con plasma de oxígeno. a) Perfil de espesores de la película delgada medido por AFM; b) histograma de los valores de espesor medidos y valor promedio; c) imagen AFM de la película delgada; y d) variación del espesor a lo largo de la línea trazada en la imagen anterior.

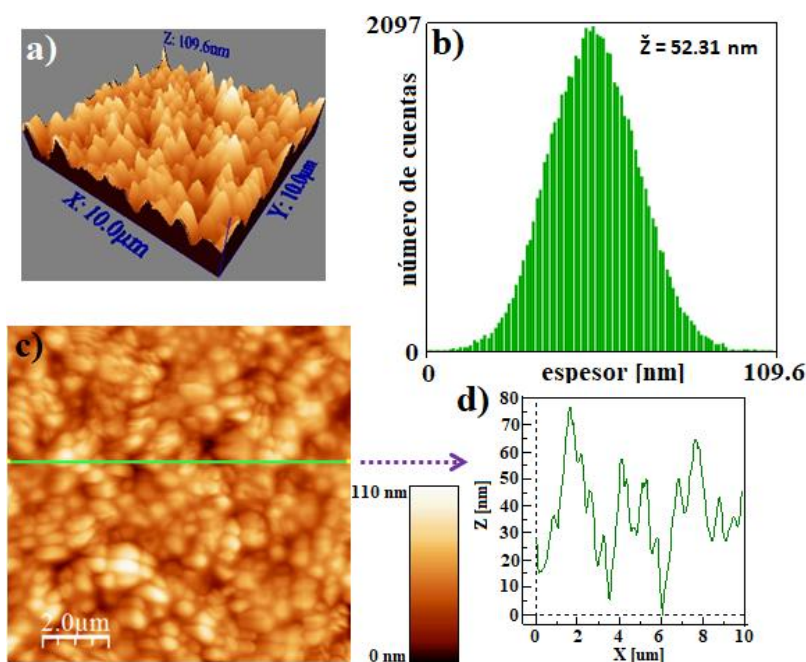


Figura 4.21: Película delgada preparada mediante espín-coating múltiple obtenida a una razón 1/0.50 calcinada a 450 °C. a) Perfil de espesores de la película delgada medido por AFM; b) histograma de los valores de espesor medidos y valor promedio; c) imagen AFM de la película delgada; y d) variación del espesor a lo largo de la línea trazada en la imagen anterior.

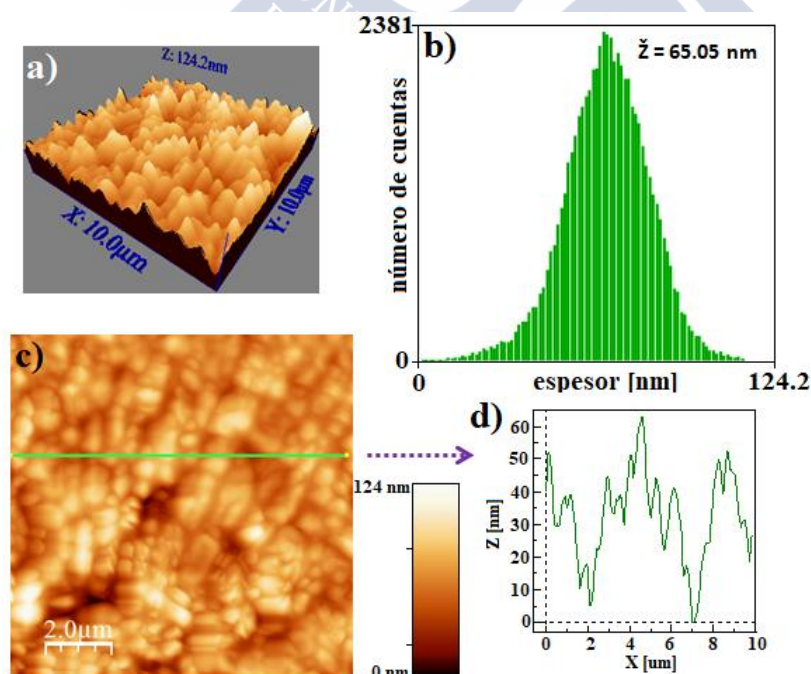


Figura 4.22: Película delgada preparada mediante espín-coating múltiple obtenida a una razón 1/4.00 irradiada con plasma de oxígeno. a) Perfil de espesores de la película delgada medido por AFM; b) histograma de los valores de espesor medidos y valor promedio; c) imagen AFM de la película delgada; y d) variación del espesor a lo largo de la línea trazada en la imagen anterior.

Además, se observa que la técnica de espín-coating múltiple da lugar a nanosistemas de MNPs con un grado de ordenamiento reducido, en los que el material magnético se acumula sobre los sustratos de forma bastante inhomogénea (Figuras 4.20c, 4.21c y 4.22c). Los perfiles de espesor de las películas delgadas sintetizadas muestran superficies libres irregulares en las que el espesor varía desde cero hasta, en alguno de los casos, más de 200 nm. Por todo esto, se concluye la necesidad de optimización del método sintético de la deposición múltiple por espín-coating para la preparación de las películas delgadas, con el fin de obtener películas de mayor espesor y con grados de orden y homogeneidad similares a los de las películas obtenidas por espín-coating simple.

Finalmente, se midieron las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado a temperaturas de 5 K y 300 K para la película delgada obtenida a una razón molar P4VP-FAA 1/0.50 que fue tratada en atmósfera de dioxano y calcinada a 450 °C, y en cuya imagen de SEM se podían observar que las MNPs se disponían sobre el sustrato sin agregación y con un elevado grado de orden (Figura 4.14b). Las curvas muestran que el nanosistema presenta un comportamiento diamagnético^{34,35} propio del sustrato de silicio (Figura 4.23), siendo la cantidad de material magnético depositado insuficiente para obtener una respuesta magnética. Nótese que, en este caso, no tiene sentido el analizar el comportamiento magnético de las muestras sintetizadas mediante la técnica de espín-coating múltiple o de aquellas sintetizadas con una alta concentración de precursor magnético, en las que las MNPs se constituían en forma de grandes agregados que recubrían la práctica totalidad de los sustratos. De igual forma que para determinar la composición y estructura de las MNPs su grado de ordenamiento y aglomeración no es especialmente relevante, las medidas magnéticas cambian completamente cuando las MNPs se agregan/aglomeran y pasan a mostrar un comportamiento colectivo. Es, por ello, que el magnetismo debe ser determinado directamente en aquellos sistemas en los que las MNPs cumplen las características de monodispersidad y homogeneidad deseadas, no proporcionando ninguna información relevante aquellas medidas magnéticas de sistemas con mayor cantidad del mismo material magnético pero agregado y/o más desordenado.

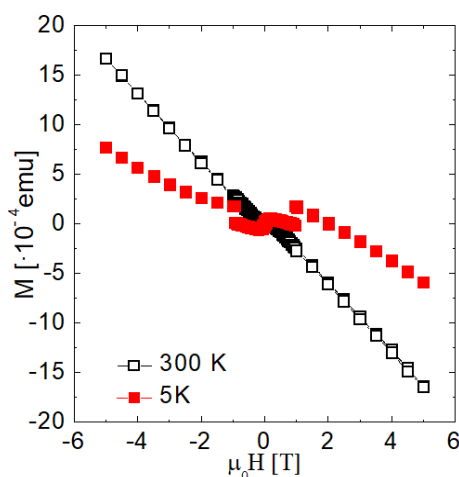


Figura 4.23: Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado a 5 K y a 300 K de la película delgada preparada mediante la técnica de espín-coating a una razón P4VP-FAA 1/0.50 sometida a atmósfera de dioxano y calcinada a 450 °C.

4.3. Bibliografía

1. Lee, C., Kim, S. H. & Russell, T. P. Controlling orientation and functionalization in thin films of block copolymers. *Macromol. Rapid Commun.* **30**, 1674–1678 (2009).
2. Bang, J., Jeong, U., Ryu, D. Y., Russell, T. P. & J Hawker, C. Block copolymer nanolithography: Translation of molecular level control to nanoscale patterns. *Adv. Mater.* **21**, 4769–4792 (2009).
3. Rodgers, J. M., Jewell, T. E., Bridgewater, N. J. Apparatus for Semiconductor Lithography. 9563 (1990).
4. Kim, H. C., Park, S. M., Hinsberg, W. D. & Division, I. R. Block copolymer based nanostructures: Materials, processes, and applications to electronics. *Chem. Rev.* **110**, 146–177 (2010).
5. Majetich, S. A., Wen, T. & Booth, R. A. Functional magnetic nanoparticle assemblies: Formation, collective behavior, and future directions. *ACS Nano* **5**, 6081–6084 (2011).
6. Kuila, B. K., Rama, M. S. & Stamm, M. Supramolecular assembly of poly(styrene)-b-poly(4-vinylpyridine) and ferroceneacetic acid: An easy way to large-scale controllable periodic arrays of iron oxide nanomaterials. *Adv. Mater.* **23**, 1797–1800 (2011).
7. Sohn, B. H. *et al.* Directed self-assembly of two kinds of nanoparticles utilizing

- monolayer films of diblock copolymer micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6368–6369 (2003).
8. Shin, D. O. *et al.* Sub-nanometer level size tuning of a monodisperse nanoparticle array via block copolymer lithography. *Adv. Funct. Mater.* **21**, 250–254 (2011).
9. Kim, S. S., Kang, D. & Sohn, B. H. Fabrication of size-controlled nanoring arrays by selective incorporation of ionic liquids in diblock copolymer micellar cores. *Nanotechnology* **28**, 225303 (2017).
10. Cheng, J. Y. *et al.* Formation of a cobalt magnetic dot array via block copolymer lithography. *Adv. Mater.* **13**, 1174–1178 (2001).
11. Kuila, B. K. & Stamm, M. Block copolymer–small molecule supramolecular assembly in thin film: a novel tool for surface patterning of different functional nanomaterials. *J. Mater. Chem.* **21**, 14127 (2011).
12. Puišo, J., Lindroos, S., Tamulevicius, S., Leskelä, M. & Snitka, V. The Influence of the Pretreatment of Si Substrate on the Growth of PbS Thin Films in the SILAR Technique. *Solid State Phenom.* **94**, 261–264 (2003).
13. Laforgue, A., Bazuin, C. G. & Prud'homme, R. E. A study of the supramolecular approach in controlling diblock copolymer nanopatterning and nanoporosity on surfaces. *Macromolecules* **39**, 6473–6482 (2006).
14. Park, M., Harrison, C., Chaikin, P. M., Register, R. A. & Adamson, D. H. Block copolymer lithography: Periodic arrays of ~1011 holes in 1 square centimeter. *Science* (80-.). **276**, 1401–1404 (1997).
15. Segalman, R. A., Yokoyama, H. & Kramer, E. J. Graphoepitaxy of spherical domain block copolymer films. *Adv. Mater.* **13**, 1152–1155 (2001).
16. Ruiz, R. *et al.* Density multiplication and improved lithography by directed block copolymer assembly. *Science* (80-.). **321**, 936–939 (2008).
17. Rider, D. A. *et al.* Nanostructured magnetic thin films from organometallic block copolymers: Pyrolysis of self-assembled polystyrene - block - poly (ferrocenylethylmethylsilane). *ACS Nano* **2**, 263–270 (2008).
18. Joy, D. C. Scanning Electron Microscopy. in *Materials Science and Technology* (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006). doi:10.1002/9783527603978.mst0012

19. Park, S., Kim, B., Wang, J.-Y. & Russell, T. P. Fabrication of Highly Ordered Silicon Oxide Dots and Stripes from Block Copolymer Thin Films. *Adv. Mater.* **20**, 681–685 (2008).
20. Che, M. L., Teng, J. Y., Lai, P. C. & Leu, J. Moisture uptake and dielectric property of methylsilsesquioxane/high- temperature porogen hybrids and porous low-k films. *J. Mater. Res.* **26**, 2987–2995 (2011).
21. Lawes, G. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. (Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1987).
22. Holy, V., Holý, V., Pietsch, U. & Baumbach, T. High-Resolution X-Ray Scattering from Thin Films and Multilayers. *High-Resolution X-Ray Scatt. from Thin Film. Multilayers* **149**, 81–112 (1999).
23. Saito, Y. *X-Ray Diffraction*. (Dover Publications, 1979). doi:10.1007/978-3-642-67181-4_2
24. Ozaki, K., Hanatani, T. & Nakamura, T. Analysis of crystalline phases in airborne particulates by grazing incidence X-ray diffractometry. *Analyst* **130**, 1059–1064 (2005).
25. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. & Kim, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 023501 (2015).
26. Lassoued, A., Dkhil, B., Gadri, A. & Ammar, S. Control of the shape and size of iron oxide (α -Fe₂O₃) nanoparticles synthesized through the chemical precipitation method. *Results Phys.* **7**, 3007–3015 (2017).
27. Daillant, Jean, Gibaud, A. *X-Ray and Neutron reflection: principles and applications*. (Springer, 1999). doi:10.1007/978-3-540-88588-7
28. Schreiber, F. & Gerlach, A. X-ray and Neutron Reflectivity for the Investigation of Thin Films. *Physchem* 1–9
29. Als-Nielsen J., M. D. *Elements of Modern X-Ray Physics.pdf*. Wiley, New York (Wiley, 2001). doi:10.1002/9781119998365
30. Sukanek, P. C. Dependence of Film Thickness on Speed in Spin Coating. *J. Electrochem. Soc.* **138**, 1712 (1991).
31. Bouchoms, I. P. M., Schoonveld, W. A., Vrijmoeth, J. & Klapwijk, T. M. Morphology

- identification of the thin film phases of vacuum evaporated pentacene on SiO₂ substrates. *Synth. Met.* **104**, 175–178 (1999).
32. Morita, S., Giessibl, F., Wiesendanger, R. *Non Contact Atomic Force Microscopy. Probe Microscopy* **2**, (2009).
33. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).
34. Essen, H. & Fiolhais, M. C. N. Meissner effect, diamagnetism, and classical physics - a review. *Am. J. Phys.* **80**, 164–169 (2011).
35. Rumpf, K. & Granitzer, P. Diamagnetic behavior of porous silicon. in *Handbook of Porous Silicon* 1–5 (Springer International Publishing, 2014). doi:10.1007/978-3-319-05744-6_29





5. Aplicaciones

En el presente Capítulo se abordará el estudio de diferentes potenciales aplicaciones de los sistemas de nanopartículas magnéticas (MNPs) basadas en óxidos de hierro sintetizados en los capítulos anteriores.

En primer lugar, se analizó la capacidad hipertérmica de las MNPs de forma cúbica y esférica sintetizadas en los Capítulos 2 y 3, respectivamente, a través de la determinación de sus tasas de absorción específicas (SAR). Esta magnitud, como se comentó previamente, representa la capacidad de un sistema para absorber energía de un campo magnético y convertirla en calor, generando de este modo un incremento de temperatura local que puede ser empleado para, por ejemplo, la destrucción de células cancerígenas^{1,2}. El trabajo desarrollado se centró particularmente en analizar la influencia de los diferentes dopajes de las MNPs sobre la capacidad de estas como agentes hipertérmicos. Para ello, se utilizaron las partículas ya transferidas a medio acuoso mediante su recubrimiento polimérico con el complejo PMA-dodecilamina³. Los campos magnéticos alternos aplicados en cada caso respetaron los límites de amplitud y frecuencia establecidos de cara a su posible aplicación en la práctica clínica^{4,5}.

Las MNPs típicamente ensayadas en los experimentos de hipertermia magnética presentan un comportamiento superparamagnético, como las MNPs de forma esférica sintetizadas en el Capítulo 2 debido, como ya fue explicado, a su reducida tendencia a la agregación⁶. Las MNPs ferro- o ferrimagnéticas, al presentar áreas no despreciables en sus ciclos de histéresis, tienen una mayor capacidad de absorber energía de un campo magnético aplicado y, por tanto, mayor potencial como agentes hipertérmicos. Sin embargo, la existencia de una magnetización remanente también provoca la tendencia de este último tipo de MNPs a agregarse, lo cual supone un gran inconveniente de cara a sus posibles aplicaciones biológicas^{7,8}. Las MNPs ferro- o ferrimagnéticas de dimensiones reducidas, ligeramente por encima del tamaño de transición a régimen superparamagnético, como los nanocubos sintetizados en el Capítulo 3, presentan unas características particularmente interesantes para tratamientos de hipertermia magnética debido al compromiso existente entre su importante capacidad de generación de calor y su baja tendencia a constituirse en forma de clústeres al aplicar campos magnéticos externos⁸.

Por otra parte, también se evaluó la capacidad de los sistemas magnéticos sintetizados como potenciales agentes de contraste para imagen por resonancia magnética (MRI) a través de la determinación de sus coeficientes de relajación transversales⁹ (r_2). El análisis efectuado se centró en la influencia de los diferentes grados de dopaje sobre el valor de los coeficientes r_2 de los sistemas, puesto que las MNPs basadas en óxidos de hierro de tamaños superiores a ca. 6-7 nm presentan una influencia mucho más grande sobre las relajaciones transversales que sobre las longitudinales^{10,11,12}, generando un oscurecimiento en la señal MRI (contraste negativo).

A continuación, aquellas MNPs que mostraron una mayor potencia magnética en base a las medidas efectuadas fueron seleccionadas para su análisis en cultivos celulares *in vitro*. En particular, se llevaron a cabo ensayos para determinar su nivel de citotoxicidad en diferentes líneas celulares, su grado de internalización celular y la posible variación de sus propiedades magnéticas al encontrarse en el entorno celular.

Por último, se analizó también la posible aplicación de las MNPs obtenidas como nanosistemas útiles en la purificación de efluentes acuosos contaminados con diferentes metales pesados, tales como arsénico y mercurio, el cual supone uno de los principales problemas a nivel sanitario y ambiental de cara a asegurar un suministro de agua potable sostenible¹³. Se utilizaron para dicho propósito distintas MNPs de forma esférica sintetizadas previamente en el Capítulo 3, teniendo lugar la eliminación de los metales contaminantes mediante procesos de adsorción superficial, los cuales fueron estudiados cinéticamente y modelizados para conocer cómo proceden.

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Materiales

Los reactivos empleados para la síntesis de las diferentes MNPs así como para su transferencia a medio acuoso son los previamente indicados en los apartados de Materiales y Métodos de los Capítulos 2 y 3.

Por su parte, las disoluciones de arsénico y mercurio de diferentes concentraciones utilizadas en los ensayos de purificación de agua se prepararon diluyendo unas disoluciones base de arsenito de potasio (99.9%) y nitrato de mercurio

(99%) en agua, ambas de concentración 0.05 M, suministradas por *Chem-Lab* y *Fluka*, respectivamente.

Para los ensayos celulares se utilizaron medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suero fetal bovino (FBS), L-glutamina, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomicina y el test de proliferación celular CCK-8, todos ellos adquiridos en *Invitrogen*. Las líneas celulares HeLa (cáncer cérvico-uterino), MDA-MB-231 (cáncer de mama) y RAW 264.7 (macrófagos murinos) fueron facilitadas por *Cell BioLabs*. Los reactivos prussian blue, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), bodipi-faloidina, paraformaldehído y triton X-100, empleados para los estudios de internalización celular de las MNPs, así como las placas de cultivo de 6 y 96 pocillos y los cristales de cultivo recubiertos con poli-L-lisina de 12x12 mm fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich*. Todos los demás reactivos empleados, de grado analítico, también fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich* y usados tal y como se recibieron.

5.1.2. Síntesis y transferencia de las MNPs a medio acuoso

La síntesis de las MNPs de forma cúbica de diferentes composiciones con tamaños de arista de ca. 30 y 40 nm y su transferencia a medio acuoso mediante su recubrimiento polimérico con el complejo PMA-dodecilamina o mediante un proceso de intercambio de ligando con DMSA se llevaron a cabo según los protocolos ya expuestos en los Apartados 2.1.2 y 2.1.3 del Capítulo 2. Por su parte, las síntesis de las MNPs de forma esférica de diferentes composiciones, con un diámetro de ca. 8.50 nm, se efectuaron siguiendo el protocolo indicado en el Apartado 3.1.2 del Capítulo 3, siendo transferidas a medio acuoso mediante el proceso de recubrimiento polimérico detallado en el Apartado 3.1.3 del mismo Capítulo.

5.1.3. Medidas de hipertermia y relajación magnéticas

Para las medidas de la capacidad hipertérmica de los nanocubos sintetizados en el Capítulo 2, las disoluciones acuosas se sometieron a un campo magnético alterno de 300 G ($\sim 23 \text{ KA} \cdot \text{m}^{-1}$) de amplitud y 293 KHz de frecuencia durante 5 min., registrando durante dicho intervalo el incremento de temperatura producido. En las MNPs esféricas

sintetizadas en el Capítulo 3, en cambio, la capacidad hipertérmica fue medida en disoluciones acuosas sometidas a un campo magnético alterno aplicado de 230 G ($\sim 17 \text{ KA}\cdot\text{m}^{-1}$) de amplitud y 850 KHz de frecuencia, registrando en esta ocasión la temperatura durante 15 min. El cambio en las condiciones de estas últimas medidas obedeció a la no disponibilidad del equipo en el que se habían efectuado los experimentos con los nanocubos.

La capacidad hipertérmica de las distintas MNPs se obtuvo a través de los valores del SAR que se midieron colocando las muestras en el seno de una bobina refrigerada dentro de un portamuestras adiabático, y se determinaron a partir de la pendiente de la curva de calentamiento durante los primeros segundos¹⁴ (ecuación 5.1).

$$SAR = \frac{C_{media} \cdot \rho_{media}}{C_{MNPs}} \cdot \frac{dT}{dt} \quad (5.1)$$

dónde C_{media} es la capacidad calorífica del medio donde la muestra está dispersa (por ejemplo, en el caso del agua, $4.19 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), ρ_{media} es la densidad de este mismo medio ($1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ en el caso del agua), C_{MNPs} es la concentración de MNPs, y dT/dt es la pendiente de la curva de calentamiento durante los primeros 10-30 s.

Para las medidas de relajación magnética de las MNPs se prepararon varias disoluciones de diferentes concentraciones de cada una de ellas. Cada una de estas muestras fue sometida a un campo magnético midiéndose el tiempo de relajación T_2 , esto es, el tiempo necesario para que la magnetización transversal de las muestras disminuya desde el valor máximo hasta un valor del 37% de este mismo valor. Posteriormente, el ajuste lineal de los inversos de los tiempos de relajación frente a la concentración molar de las disoluciones para cada una de las MNPs permitió determinar su coeficiente de relajación, r_2 ⁹ (ecuación 5.2).

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_{2,0}} + r_2 \cdot C \quad (5.2)$$

dónde T_2 es el tiempo de relajación transversal, $T_{2,0}$ es el tiempo de relajación antes de haber añadido el agente de contraste (s), r_2 es el coeficiente de relajación transversal ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y C es la concentración del agente de contraste utilizado (mM).

5.1.4. Análisis de la citotoxicidad, de la internalización celular y de las propiedades magnéticas de las MNPs dentro de las células

Las diferentes líneas celulares empleadas fueron cultivadas e incubadas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% (v/v) de L-glutamina, penicilina/estreptomicina, piruvato sódico y aminoácidos no esenciales, manteniéndose las placas de cultivo en todo momento a una temperatura de 37 °C y bajo una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

Para los ensayos de citotoxicidad, las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos (100 µl, 10⁴ células por pocillo) e incubadas durante 24 h para su correcta fijación a la superficie. Posteriormente, se añadieron 20 µl de disoluciones acuosas de las distintas MNPs a diferentes concentraciones, y las células fueron nuevamente incubadas a distintos tiempos. Algunos pocillos conteniendo únicamente células fueron incubados como control positivo (blancos, 100% de viabilidad celular). Finalizado el periodo de incubación, el medio celular de cada pocillo se reemplazó por 90 µl de medio fresco con 10 µl de CCK-8 y, transcurridos 45 min., se midió la absorbancia a 450 nm de las muestras usando un lector de placas UV-VIS. El porcentaje de viabilidad celular se determinó siguiendo la ecuación 5.3:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{Abs_{\text{muestra}}}{Abs_{\text{blanco}}} \cdot 100 \quad (5.3)$$

dónde Abs_{muestra} es la absorbancia a 450 nm de los pocillos incubados con células y MNPs y Abs_{blanco} es la absorbancia en ausencia de MNPs. Todos los ensayos fueron efectuados por triplicado.

La internalización celular de las MNPs fue monitorizada mediante microscopía óptica y confocal. En ambos estudios, se sembraron células HeLa sobre cristales de cultivo recubiertos con poli-L-lisina de 12x12 mm colocados en placas de 6 pocillos (2.5 ml, 2.5·10⁵ células por pocillo) y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, se añadieron 100 µl de las disoluciones acuosas de MNPs a la máxima concentración determinada previamente como no tóxica y se realizó la incubación a distintos tiempos. A continuación, se retiró el medio de los pocillos y se añadió 1 ml de PBS que fue retirado tras una breve agitación manual. Se repitió este proceso dos veces más para asegurar la correcta eliminación de las MNPs no internalizadas y de las células no

adheridas a los cristales de cultivo. En las muestras de microscopía óptica, a fin de dotar a las MNPs de un mayor contraste, tras el proceso de lavado en algunos ensayos se añadieron 200 µl de una mezcla 50:50 (v/v) de ácido clorhídrico 20 % (v/v) y una disolución de prussian blue en agua 10% (w/v) durante 15 min., actuando este reactivo como tinción del hierro presente en el medio celular¹⁵. Los cristales fueron finalmente lavados con PBS tres veces antes de ser observados en el microscopio. En microscopía confocal, por su parte, tras el proceso de lavado las células de cada cristal se fijaron añadiendo gota a gota 200 µl de una disolución de paraformaldehído en PBS 4% (w/v), manteniendo el recubrimiento durante 10 min. A continuación, las muestras se lavaron tres veces con PBS, se permeabilizaron con 200 µl de una disolución de triton X-100 en PBS 0.2% (w/v), y se lavaron de nuevo tres veces con PBS. Posteriormente, el citoplasma de las células se tiñó añadiendo 200 µl de una disolución de bodipi-faloidina en PBS 5% (v/v) e incubando durante 30 min. a temperatura ambiente en completa oscuridad. Después, se lavaron las muestras tres veces con PBS y los cristales de cultivo se montaron sobre un portamuestras de vidrio. Para teñir el núcleo de las células se añadieron 2-3 gotas del reactivo DAPI sobre los cristales y se colocó sobre los mismos un cubreobjetos que fue fijado con resina. Las muestras se almacenaron finalmente 12 h a -20 °C antes de su observación para su curado.

Para efectuar el análisis de las propiedades magnéticas de las MNPs una vez internalizadas dentro de las células, estas se cultivaron en placas de 6 pocillos (2 ml, $5 \cdot 10^5$ células por pocillo) y se incubaron durante 24 h para su correcta fijación a la superficie de los recipientes. Posteriormente, se añadieron 100 µl de una disolución acuosa de las MNPs a la concentración más elevada establecida previamente como no tóxica, incubándose durante 6 h más. Finalizado este periodo, se retiró el medio de cada pocillo y se añadió 1 ml de PBS, que tras una breve agitación manual también fue eliminado, repitiéndose este mismo proceso dos veces más para asegurar la eliminación de las MNPs no internalizadas y de las células no adheridas a los pocillos. A continuación, se añadieron 350 µl de tripsina en cada pocillo y se incubó durante 4 min. para despegar las células de la superficie de los pocillos. Para finalizar, se añadieron 650 µl de medio de cultivo fresco en cada pocillo para neutralizar la tripsina, se traspasó el contenido de los seis pocillos a un vial, y este fue centrifugado a 1200 rpm durante 4 min. El material precipitado se redispersó en 5 ml de PBS y se centrifugó nuevamente, repitiéndose este proceso 2 veces más. El material precipitado tras el último proceso de

centrifugado fue disuelto en 300 μl de una disolución de glutaraldehído en agua al 2.5% (v/v) para asegurar que las células no se rompiesen liberando las MNPs internalizadas.

5.1.5. Eliminación de metales pesados en medios acuosos

Se prepararon disoluciones de las sales de mercurio (nitrato de mercurio) y arsénico (arsenito de potasio) de diferentes concentraciones en el rango comprendido entre 1 y 750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y con distintos valores de pH entre 3 y 10. Se tomaron alícuotas de 100 ml de las disoluciones anteriores, a las que se le añadieron 60 μg de MNPs, adquiriendo estas un color marrón tenue. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en una placa de agitación mecánica a 250 rpm y 25 °C durante 24 h. Transcurrido este periodo, las MNPs se recolectaron mediante centrifugación a 10000 rpm durante 120 min., formándose un precipitado de color negro y tomando el sobrenadante una apariencia transparente. La presencia de metales pesados en los sobrenadantes fue determinada mediante ICP-MS, permitiendo conocer las cantidades que habían sido adsorbidas en la superficie de las distintas MNPs estudiadas. Bajo algunas condiciones de pH y concentración de contaminantes concretas se determinaron las cinéticas de adsorción; esto es, la evolución de las cantidades de contaminantes eliminadas con el tiempo durante las 24 h de incubación.

5.1.6. Técnicas de caracterización

Las medidas de la capacidad hipotérmica de los sistemas de MNPs de forma cúbica sintetizados en el Capítulo 2 se realizaron en un prototipo de laboratorio de la marca *nB nanoScale Biomagnetics*. Estos se colocaron en el interior de un portamuestras de teflón conectado a una bomba de ultravacío y con las paredes refrigeradas a 20 °C, con el fin de evitar el sobrecalentamiento de los elementos electrónicos en contacto. Se utilizaron disoluciones de las MNPs, ya recubiertas con el complejo polimérico y disueltas en agua, de 160 μl de volumen. La temperatura fue medida con un termómetro de fibra óptica durante 3-5 min. en intervalos de 1 s bajo un campo magnético alterno de 300 G de amplitud y 293 KHz de frecuencia. Por su parte, las medidas de la capacidad hipotérmica de los sistemas de MNPs de forma esférica sintetizados en el Capítulo 3 se realizaron en un equipo modelo *DM 100* de la marca *nB*

nanoScale Biomagnetics. Se utilizaron disoluciones de las MNPs, ya recubiertas con el complejo polimérico y disueltas en agua, de 300 μl de volumen. La temperatura fue medida con un termómetro de fibra óptica durante 15 min. en intervalos de 1 s bajo un campo magnético alterno de 230 G de amplitud y 850 KHz de frecuencia.

Las medidas de relajación de las MNPs de forma cúbica se realizaron bajo la aplicación de un campo magnético de 3 T con un gradiente de $440 \text{ mT}\cdot\text{m}^{-1}$, utilizando un equipo de la marca *Bruker BioSpin*. Se prepararon siete disoluciones de cada sistema de MNPs, de volumen de 200 μl y con concentraciones en el rango de 0.04 mM a 1.50 mM. Las medidas de relajación de las MNPs de forma esférica, por su parte, se llevaron a cabo bajo la aplicación de un campo magnético de 3 T de amplitud con un gradiente de $480 \text{ mT}\cdot\text{m}^{-1}$, utilizando en este caso un escáner modelo *MR Solutions Benchtop*, de la marca *Guildford*. Se prepararon cuatro disoluciones de cada sistema de MNPs de 200 μl de volumen total y de concentraciones metálicas en el rango de 0.04 mM a 0.85 mM. En ambos tipos de sistemas, las pendientes de la rectas de ajuste de los valores de T_2^{-1} frente a la concentración metálica de las disoluciones de MNPs permitieron determinar los coeficientes de relajación r_2 de las diferentes muestras.

Las absorbancias a 450 nm para evaluar la citotoxicidad celular de las MNPs fueron medidas utilizando un lector de placas UV-VIS modelo 689 de la marca *Bio-Rad*. Para evaluar el grado de internalización de las MNPs en las células, las muestras se visualizaron con un objetivo de aceite 63X usando un microscopio de epifluorescencia *Leica DMI6000B* equipado con un sistema modular *Leica AF6000* y una cámara *DFC3665FX* (*Leica Microsystems GmbH*), dónde el canal azul correspondía al DAPI (355 nm) y el canal rojo a la bodipi-faloidina (633 nm). Asimismo, también fue utilizado un microscopio óptico modelo *Eclipse TS100* de la marca *Nikon* equipado con una cámara *ColorView12* actuando en un rango de 10X a 40X. Las preparaciones de las muestras se llevaron a cabo siguiendo los protocolos indicados en el Apartado 5.1.4.

Las concentraciones de las disoluciones de MNPs así como las cantidades de mercurio y arsénico adsorbidas se determinaron mediante espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). El equipo utilizado fue un ICP-MS modelo *Agilent 7700x* con sistema de introducción de muestras formado por un nebulizador *Micromist glass slow-flow*, una cámara de spray de vidrio de doble paso con sistema Peltier y una antorcha de cuarzo, trabajando con una potencia de 1550 W y un flujo de

plasma de $15 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$. Para la preparación de las muestras, $40 \mu\text{l}$ de los sobrenadantes con arsénico o mercurio fueron diluidos en 1.96 ml de ácido nítrico en agua al 1% (v/v), compuesto que actúa como agente de limpieza ante la posible presencia de trazas de iones metálicos de medidas previas presentes en las tuberías del sistema de nebulización. En el caso de las disoluciones de MNPs, estas fueron primeramente diluidas en $480 \mu\text{l}$ de una mezcla $75:25$ (v/v) de ácido clorhídrico y ácido nítrico (agua regia) durante 2 h y, a continuación, se añadieron 4.5 ml de ácido nítrico en agua al 1% (v/v).

La caracterización magnética de las MNPs tras su internalización celular fue llevada a cabo en un magnetómetro SQUID (*Quantum Design MPMS5, San Diego, CA*). Las curvas de magnetización de las muestras estudiadas se midieron desde -10000 Oe a $+10000 \text{ Oe}$ a una temperatura de 300 K , registrando los datos en los intervalos indicados en la Tabla 5.1. La preparación de las muestras para las medidas en el magnetómetro se efectuó de la siguiente forma: un volumen de ca. $100 \mu\text{l}$ de una disolución de células con las MNPs internalizadas en glutaraldehído 2.5% (v/v) (de concentración previamente determinada mediante ICP-MS) fue vertido gota a gota sobre un trozo de papel de filtro de aproximadamente $1 \times 3 \text{ cm}^2$. Este papel de filtro absorbió el disolvente y, a continuación, fue secado en un horno a 60°C durante 90 min . Finalmente, el trozo de papel se colocó en el interior de la cápsula plástica que fue introducida en el magnetómetro SQUID para obtener las características magnéticas del sistema en cuestión.

Tabla 5.1: Protocolo de variación del campo magnético para la obtención de los ciclos de histéresis de los sistemas de MNPs internalizados en células ($1 \text{ T} = 10000 \text{ Oe}$).

	$\vec{B}_{\text{inic}} [\text{T}]$	$\vec{B}_{\text{fin}} [\text{T}]$	$\Delta\vec{B} [\text{T}]$
Etapas 1	1.0	0.4	-0.20
Etapas 2	0.4	0.1	-0.05
Etapas 3	0.1	-0.1	-0.01
Etapas 4	-0.1	-0.4	-0.05
Etapas 5	-0.4	-1.0	-0.20

	$\vec{B}_{\text{inic}} [\text{T}]$	$\vec{B}_{\text{fin}} [\text{T}]$	$\Delta\vec{B} [\text{T}]$
Etapas 6	-1.0	-0.4	+0.20
Etapas 7	-0.4	-0.1	+0.05
Etapas 8	-0.1	0.1	+0.01
Etapas 9	0.1	0.4	+0.05
Etapas 10	0.4	1.0	+0.20

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Medidas de la capacidad hipotérmica y la relajación transversal de las MNPs

En este primer apartado se evaluaron las capacidades de varias de las MNPs sintetizadas en los Capítulos 2 y 3 de la presente Tesis como potenciales agentes hipotérmicos y de contraste para MRI a través de las medidas de sus valores de SAR y de sus coeficientes de relajación transversales (r_2).

5.2.1.1. Medidas de la capacidad hipotérmica de las MNPs de forma cúbica

Una vez efectuada la síntesis de las MNPs de morfología cúbica, su transferencia a medio acuoso y el análisis de sus propiedades magnéticas, resultados recogidos en el Capítulo 2, se llevó a cabo, en primer lugar, el estudio de sus posibles aplicaciones en el campo de la hipertermia magnética. Así, se evaluó la capacidad hipotérmica de disoluciones acuosas de nanocubos de ca. 30 y 40 nm de longitud de arista de diferentes composiciones recubiertos con el complejo polimérico PMA-dodecilamina bajo la acción de un campo magnético aplicado alterno de 300 G ($\sim 23 \text{ KA}\cdot\text{m}^{-1}$) de amplitud y 293 KHz de frecuencia. Como se explicó en la Introducción de la presente Tesis, el campo magnético aplicado en los ensayos de hipertermia magnética debe obedecer unos ciertos valores límites de cara a evitar problemas relacionados con la aparición de corrientes magnéticas, que podrían resultar fatales en la hipotética traslación de los ensayos efectuados a la práctica clínica. Dichos límites no están establecidos de una forma absolutamente rigurosa, si bien en la práctica totalidad de los trabajos previos la amplitud y la frecuencia de los campos aplicados no suelen superar los $30 \text{ KA}\cdot\text{m}^{-1}$ y los 900 KHz, respectivamente, de modo que el producto de ambas magnitudes en ningún caso se encuentre en órdenes superiores a $10^{10} \text{ A}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, valor crítico aproximado por encima del cual las corrientes magnéticas antes mencionadas comienzan a tomar una alta relevancia⁵. Por tanto, las magnitudes características del campo magnético alterno empleado para las medidas de hipertermia en este trabajo cumplen los requisitos prefijados, siendo los valores de amplitud, frecuencia y el producto de estas inferiores a los valores establecidos como máximos.

Las muestras fueron sometidas a un campo magnético alterno de las características antes indicadas durante un período de entre 3 y 5 min., el máximo permitido en el equipo dónde se llevaron a cabo las medidas. Las curvas de calentamiento obtenidas correspondientes a los nanocubos de 30 nm y 40 nm de tamaño se muestran en la Figura 5.1.

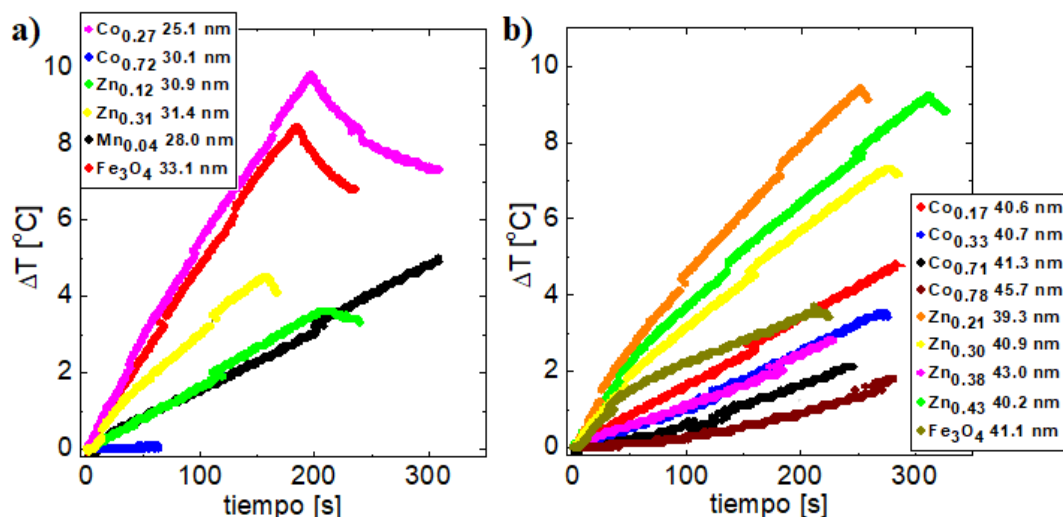


Figura 5.1: Curvas de calentamiento de los distintos nanocubos con una longitud de arista de a) ca.30 nm, y b) ca. 40 nm bajo la aplicación de un campo magnético alterno.

Tal y como se explicó previamente, las pendientes de las curvas anteriores durante los primeros segundos de calentamiento, junto con las concentraciones de las disoluciones de MNPs empleadas (determinadas mediante ICP-MS) y las constantes características del agua empleada como disolvente, pueden ser utilizadas para la determinación del SAR de los diferentes tipos de nanocubos¹⁴. En la Tabla 5.2 se muestran los valores de SAR medidos en cada sistema, así como las magnitudes necesarias para su cálculo. En este punto, es necesario comentar que son varias las posibles normalizaciones de los valores de SAR, pudiendo expresarse estos en vatios por unidad de masa de MNPs con o sin recubrimiento, en vatios por unidad de masa de elementos metálicos o, incluso, en vatios por unidad de masa de hierro, únicamente. En concordancia con gran parte de la bibliografía publicada al respecto, en este estudio los valores de SAR se expresarán en vatios por unidad de masa de los todos los elementos metálicos presentes en las MNPs^{16,17}. En la última columna de la Tabla 5.2 se muestra el valor del SAR dividido entre el producto del cuadrado de la amplitud por la frecuencia

del campo magnético alterno aplicado (300 G y 293 KHz, respectivamente). Esta magnitud está siendo actualmente empleada con el propósito de poder comparar de forma más fiel los ensayos de hipertermia llevados a cabo bajo diferentes condiciones en lo que a las características del campo magnético aplicado se refiere¹⁸.

Tabla 5.2: Valores de SAR medidos en los nanocubos de ca. 30 y 40 nm de longitud de arista.

Composición ICP-MS	Tamaño [nm]	C _{metal} [mg·ml ⁻¹]	dT/dt [K·s ⁻¹]	SAR [W·g _{met} ⁻¹]	SAR/(H ² ·f) [pJ·m ² ·g ⁻¹ ·A ⁻²]
Fe ₃ O ₄	41.1 ± 3.1	0.363	0.035	404.2 ± 6.0	2.608 ± 0.039
Co _{0.17} Fe _{2.83} O ₄	40.6 ± 2.6	0.136	0.029	884 ± 13	5.703 ± 0.084
Co _{0.33} Fe _{2.67} O ₄	40.7 ± 2.7	0.109	0.013	512.0 ± 6.2	3.303 ± 0.040
Co _{0.71} Fe _{2.29} O ₄	41.3 ± 2.7	0.131	0.006	189.0 ± 2.0	1.219 ± 0.014
Co _{0.78} Fe _{2.22} O ₄	45.7 ± 4.3	0.109	0.003	98.1 ± 1.4	0.633 ± 0.010
Zn _{0.21} Fe _{2.79} O ₄	39.3 ± 2.4	0.188	0.064	1414 ± 14	9.122 ± 0.090
Zn _{0.30} Fe _{2.70} O ₄	40.9 ± 3.3	0.111	0.044	1675 ± 16	10.81 ± 0.10
Zn _{0.38} Fe _{2.62} O ₄	43.0 ± 3.6	0.115	0.021	781.7 ± 9.0	5.043 ± 0.058
Zn _{0.43} Fe _{2.57} O ₄	40.2 ± 3.0	0.159	0.048	1237 ± 14	7.981 ± 0.090
Fe ₃ O ₄	33.3 ± 3.4	1.349	0.078	244.4 ± 2.3	1.577 ± 0.015
Co _{0.27} Fe _{2.73} O ₄	25.1 ± 1.8	0.663	0.060	377.2 ± 3.1	2.434 ± 0.020
Co _{0.72} Fe _{2.28} O ₄	30.1 ± 2.1	0.783	-	-	-
Zn _{0.12} Fe _{2.88} O ₄	30.9 ± 2.0	0.332	0.029	360.2 ± 3.6	2.324 ± 0.023
Zn _{0.28} Fe _{2.72} O ₄	33.4 ± 3.8	0.395	0.040	424.4 ± 4.6	2.738 ± 0.030
Mn _{0.04} Fe _{2.96} O ₄	28.0 ± 3.1	0.334	0.037	392.2 ± 7.0	2.530 ± 0.045

Los valores de SAR de los diferentes nanocubos se encuentran, por norma general, en el orden de varios centenares de vatios producidos por cada gramo de contenido metálico de las MNPs, llegando a alcanzarse un valor máximo superior a 1600 W·g⁻¹. Como se comentó con anterioridad, no resulta sencillo establecer una comparación entre estos valores y los obtenidos en estudios previos, debido al elevado número de parámetros que entran en juego en la determinación del SAR. Así, el tamaño concreto de los nanocubos, su composición, su recubrimiento, o la normalización empleada para los cálculos (no siempre especificada) pueden dar lugar a que los valores

de SAR determinados varíen dentro de un amplio rango. A pesar ello, la comparación con estudios previos como los llevados a cabo por Noh *et al.*¹⁷ o Guardia *et al.*¹⁹ muestran que, para MNPs cúbicas de tamaños similares, los valores de SAR normalizados con el producto del cuadrado de la amplitud por la frecuencia del campo magnético alterno aplicado obtenidos están dentro de las magnitudes que podían ser esperables.

Por otra parte, se observa que tanto en los nanocubos de 30 nm como en los de 40 nm la introducción de los diferentes elementos dopantes permite incrementar la capacidad hipotérmica de las MNPs cúbicas de forma notable con respecto a las no dopadas, manteniendo sus características de tamaño, morfología y monodispersidad. Cabe destacar también que los valores de SAR son más elevados en los nanocubos de ca. 40 nm de longitud de arista que en los de 30 nm. En el Capítulo 2 se analizaron los ciclos de histéresis de los diferentes nanocubos sintetizados, comprobándose que los valores de saturación y coercitividad y, por tanto, las áreas de los ciclos de histéresis, eran tan solo ligeramente mayores en los nanocubos de 40 nm que en los de 30 nm. De este modo, que las diferencias entre los valores de SAR entre unas MNPs y otras sean notables implica que, o bien la aplicación de campos magnéticos alternos aumenta la diferencia entre las áreas de los ciclos de histéresis respectivos, o bien los demás mecanismos de generación de calor son más relevantes en los nanocubos de mayor tamaño.

A continuación, se intentó relacionar la capacidad hipotérmica de los diferentes sistemas de MNPs con su grado de dopaje y, en base a los estudios magnéticos desarrollados en páginas previas, con las magnitudes características de los ciclos de histéresis de los mismos. Es importante tener presente que la relación entre los valores de SAR medidos para cada tipo de partícula y el tamaño de los ciclos de histéresis no debe seguir necesariamente un criterio de proporcionalidad. En primer lugar, y como se mencionó anteriormente, las pérdidas energéticas que se transforman en calor y pueden ser cuantificadas a través del tamaño del ciclo de histéresis suponen sólo una de las contribuciones, aunque la principal, a la capacidad hipotérmica de las MNPs, junto con, fundamentalmente, los llamados mecanismos de relajación de Néel y de Brown²⁰. En segundo lugar, debe considerarse que los ciclos de histéresis medidos fueron obtenidos bajo la aplicación de un campo magnético continuo y no alterno como el empleado para las medidas de hipertermia, que tenderá a aumentar los tamaños de dichos ciclos.

Además, las amplitudes de los campos alternos típicamente utilizados en los ensayos de hipertermia son muy inferiores a los valores que originan saturación, por lo que los ciclos de histéresis que experimentan las partículas son, en realidad, menores a los medidos en el magnetómetro. De este modo, el ritmo de variación de la magnetización a campos bajos puede tener incluso más influencia en los valores de SAR que los valores de las saturaciones o las coercitividades determinadas previamente. Sin embargo, los ciclos de histéresis y las magnitudes características de los mismos bajo campos continuos son fáciles y rápidas de determinar, por lo que, de encontrar una relación de equivalencia entre los valores de SAR y estas, podría establecerse de forma inmediata un buen criterio que nos ayudase a determinar las MNPs óptimas para esta aplicación.

Dado el reducido número de muestras en las que se consiguió incorporar manganeso a su estructura, haciéndolo además en muy bajo porcentaje, el análisis a realizar se centrará en los efectos de los dopajes con zinc y cobalto. Cabe destacar, asimismo, que la muestra de composición $\text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{2.28}\text{O}_4(30\text{ nm})$ presentó un elevado grado de precipitación de las MNPs durante el ensayo de hipertermia debido, probablemente, a una incorrecta funcionalización polimérica y transferencia a medio acuoso, que provocó que su estabilidad coloidal se viese reducida, haciendo que las MNPs precipitasen bajo la presencia de un campo magnético alterno aplicado. Debido a este problema, los incrementos de temperatura medidos fueron prácticamente nulos.

En la Figura 5.2 se muestran las representaciones gráficas de los valores de SAR medidos frente a las estequiometrías de cobalto y zinc en las MNPs cúbicas dopadas con dichos elementos.

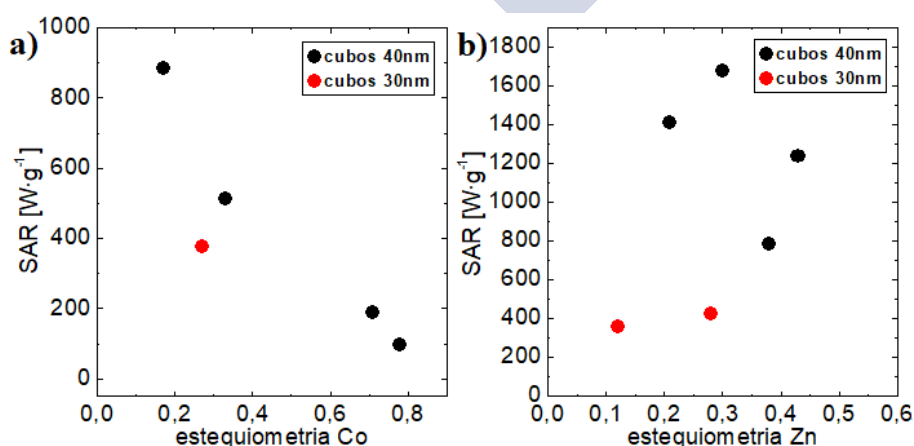


Figura 5.2: Valores de SAR frente a la estequiometría del elemento dopante en los nanocubos modificados con a) cobalto, y b) zinc. Incertidumbre estimada máxima $\pm 4\%$.

En el caso de los dopajes con cobalto (Figura 5.2a) la dependencia observada está claramente definida: a partir de un cierto grado de dopaje los valores de SAR de los nanocubos decaen a medida que se incrementa la cantidad de cobalto presente en las muestras. Los grados de sustitución bajos con este elemento sirven para elevar el SAR de forma importante con respecto al medido en los nanocubos sin dopar, llegando a alcanzarse valores cercanos a $900 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ en los nanocubos de 40 nm ($\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$) y de casi $400 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ en los de 30 nm ($\text{Co}_{0.27}\text{Fe}_{2.73}\text{O}_4$), respectivamente. Sin embargo, a medida que se aumenta la presencia de cobalto en la estructura de las MNPs los valores de SAR decaen de forma importante, siendo inferiores al de las MNPs sin dopaje a estequiometrías superiores a ca. 0.40. Asimismo, la Figura 5.2a también confirma la mayor capacidad hipotérmica de los nanocubos de 40 nm con respecto a los de 30 nm con estequiometrías similares.

Por su parte, en las NPs cúbicas dopadas con zinc (Figura 5.2b) se observan, en primer lugar, capacidades hipotérmicas superiores a las de las MNPs dopadas con cobalto, encontrando hasta tres muestras con valores de SAR superiores a $1200 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$, alcanzándose un valor máximo de $1675 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ en los nanocubos de 40 nm ($\text{Zn}_{0.30}\text{Fe}_{2.70}\text{O}_4$), muy superior también al de las muestra sin dopar de similares características de morfología y tamaño. Asimismo, vuelve a quedar patente la menor capacidad hipotérmica de los nanocubos de 30 nm. En este caso, la dependencia del SAR con el grado de dopaje es menos clara, si bien puede observarse una capacidad hipotérmica máxima cuando la estequiometría de zinc se encuentra en el rango de 0.20-0.30, fuera de cuyo intervalo decae ligeramente. Los nanocubos de 40 nm y composición $\text{Zn}_{0.38}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$ muestran un valor de SAR anormalmente reducido en comparación con las demás partículas de similar tamaño dopadas con zinc, fenómeno que puede ser asociado a un proceso de transferencia a medio acuoso parcialmente defectuoso, lo cual se corrobora al detectar la existencia de una pequeña cantidad de material precipitado tras efectuar el ensayo de hipertermia.

Como se mencionó previamente, también se analizó la variación del SAR de los nanocubos magnéticos con las magnitudes características de los ciclos de histéresis (ver Figura 5.3, donde no se hacen distinciones entre las muestras dopadas con zinc y las dopadas con cobalto).

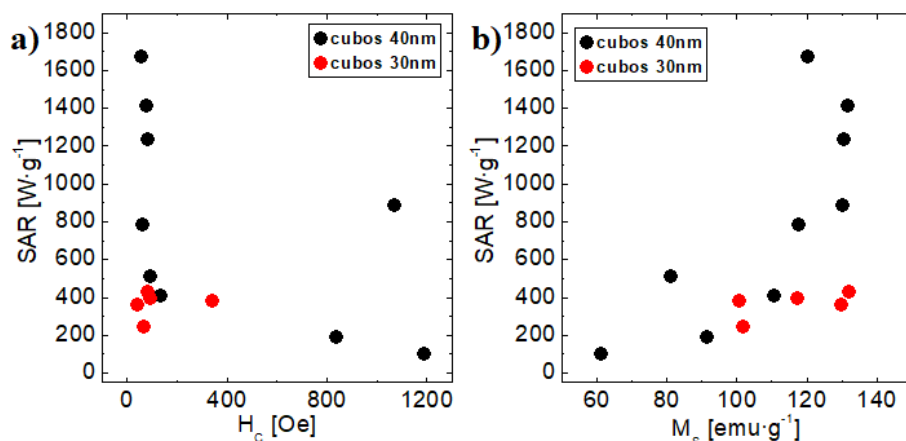


Figura 5.3: Valores de SAR de los nanocubos frente a a) campo coercitivo, y b) magnetización de saturación a temperatura ambiente. Incertidumbre estimada máxima $\pm 4\%$.

Las dependencias del SAR con los campos coercitivos y las magnetizaciones de saturación son coherentes con las determinadas previamente con los grados de dopaje. Además, al mostrar los datos correspondientes a todas las muestras sintetizadas de forma conjunta se representan una cantidad de datos lo suficientemente grande como para intentar establecer una relación entre las propiedades de forma más clara. Así, se comprueba que los valores de SAR son mayores en aquellas MNPs que presentan elevadas magnetizaciones de saturación (Figura 5.3b), comportamiento especialmente evidente en los nanocubos de 40 nm. Por su parte, los nanocubos que presentan elevados campos coercitivos muestran bajos valores de SAR, mientras que cuando el valor de la anterior magnitud es reducida, inferior o ligeramente por encima de 100 Oe, el SAR varía en un amplio rango de valores, lo que da pie a pensar en que la capacidad hipotérmica depende principalmente de otras magnitudes/parámetros como la mencionada magnetización de saturación (Figura 5.3a). Nótese que el dato experimental asociado a un elevado campo coercitivo y alto valor de SAR se corresponde con la muestra de nanocubos de 40 nm y composición $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, cuyo elevado valor de coercitividad ya se asoció previamente a un posible fenómeno de agregación al secar la muestra, dado que no era totalmente congruente con el de las demás NPs obtenidas.

Así, comparando estos datos experimentales con las relaciones observadas entre los grados de dopaje y los ciclos de histéresis, previamente establecida, se corrobora que las composiciones de MNPs que generan valores de SAR máximos son aquellas basadas en dopajes de zinc que dan lugar a elevadas magnetizaciones de saturación, lo cual se

corresponde con estequiometrías en torno a 0.30. En referencia a los dopajes con cobalto, estos pueden dar lugar a importantes incrementos en el SAR en NPs con elevadas saturaciones y bajos campos coercitivos, esto es, con dopajes de cobalto reducidos a estequiometrías inferiores a 0.15-0.20 siendo, no obstante, menores que los obtenidos con los dopajes con zinc. Este comportamiento se puede observar de forma más clara, si cabe, en los mapas de color mostrados en la Figura 5.4, en donde se representa la variación de los valores de SAR frente a las dos magnitudes de forma simultánea. De este modo, se comprueba de forma más visual que las estequiometrías de zinc y cobalto antes establecidas, así como las saturaciones y las coercitividades en los rangos ya indicados son las que dan lugar a nanocubos con mayor capacidad hipotérmica.

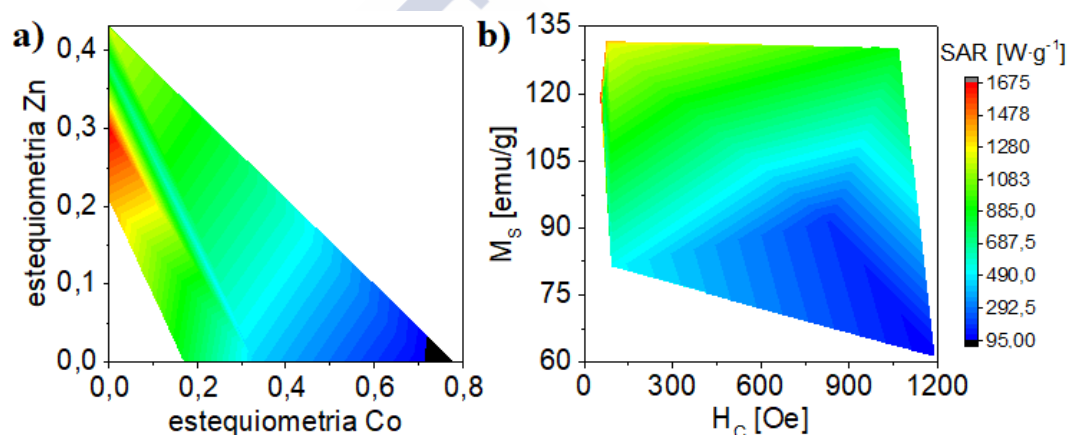


Figura 5.4: Mapas de color del SAR en función de a) las estequiometrías de zinc y de cobalto, y b) las magnetizaciones de saturación y los campos coercitivos en los nanocubos de 40 nm.

Por lo tanto, de esta representación se concluye que no existe una relación de proporcionalidad directa entre el área de los ciclos de histéresis magnética a temperatura ambiente y la capacidad hipotérmica de los nanocubos. Esta dependencia se ve alterada principalmente en las MNPs con elevados grados de dopaje de cobalto, los cuales presentan unos campos coercitivos muy elevados y, a pesar de que sus magnetizaciones de saturación son relativamente bajas, presentan unos ciclos de histéresis de área elevada dando lugar, sin embargo, a unos valores de SAR reducidos. Por el contrario, sí se observa una clara relación entre el SAR medido en los nanocubos y sus magnetizaciones de saturación, aumentando ambas magnitudes de forma conjunta. El origen del bajo SAR de las partículas con elevada sustitución de cobalto puede

atribuirse a la forma de sus ciclos de histéresis, muy anchos pero no altos. De esta forma, al llevarse a cabo las medidas de hipertermia bajo campos magnéticos aplicados de amplitudes máximas muy inferiores a las realizadas bajo campos continuos, resulta posible que aquellas MNPs con baja saturación y alta coercitividad presenten una magnetización especialmente reducida a estos campos bajos. En consecuencia, el ciclo de histéresis que realmente experimenten estas MNPs en las medidas de hipertermia sería pequeño, dando lugar a los valores más pequeños de SAR obtenidos.

5.2.1.2. Medidas de la capacidad hipertérmica de las MNPs de forma esférica

A continuación, se llevó a cabo el análisis de la capacidad hipertérmica de las MNPs de forma esférica con un tamaño aproximado de 8.50 nm sintetizadas previamente en el Capítulo 3. Se midió el SAR en disoluciones de estas MNPs en agua bajo un campo magnético alterno aplicado de 230 G ($\sim 17 \text{ KA}\cdot\text{m}^{-1}$) de amplitud y 850 KHz de frecuencia. Tal y como se mencionó anteriormente, el cambio en las características del campo magnético alterno respondió a la indisponibilidad del equipo de hipertermia en el que se efectuaron las medidas de las MNPs de forma cúbica. Por su parte, y como también se explicó previamente en el estudio de los valores de SAR de las MNPs de forma cúbica, los valores de amplitud y frecuencia del campo magnético alterno implementado en este caso también cumplen los límites establecidos de cara a la traslación de los ensayos a la práctica clínica, si bien en esta ocasión el producto de ambas magnitudes se encuentra dentro del orden de magnitud establecido como umbral⁵ ($H\cdot f = 1.4\cdot 10^{10} \text{ A}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)

En la Figura 5.5 se muestran las curvas de calentamiento de las diferentes ferritas de simetría esférica dopadas con cobalto, manganeso y zinc bajo un campo magnético alterno aplicado. Las muestras son sometidas al campo magnético durante 15 min., periodo durante el cual la temperatura de las diferentes disoluciones se incrementa de forma más o menos abrupta. Transcurridos los 15 min., y retirado el campo externo, se observa como la temperatura comienza a decaer. A partir de las pendientes de las curvas anteriores durante los primeros segundos del calentamiento y de la concentración de MNPs en las disoluciones empleadas, se puede calcular el SAR de las diferentes ferritas esféricas de ca. 8.50 nm de diámetro sintetizadas¹⁴.

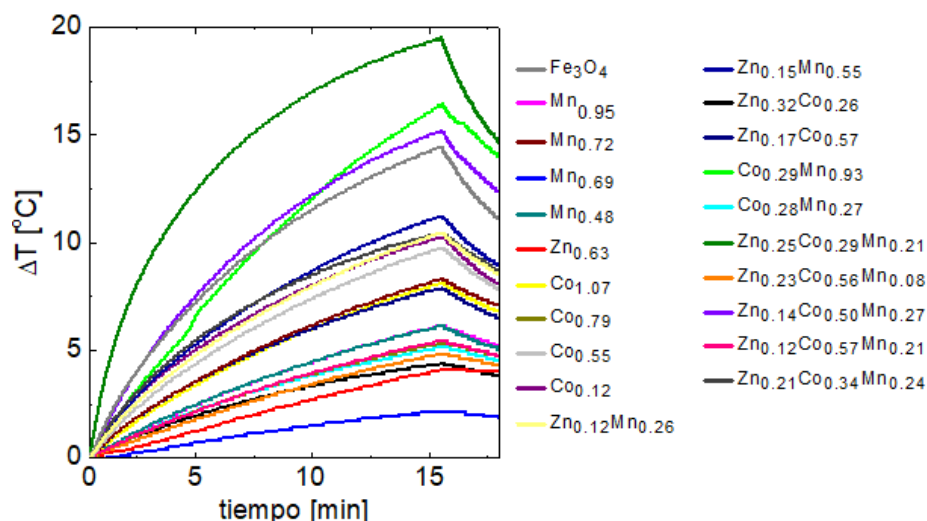


Figura 5.5: Curvas de calentamiento bajo la aplicación de un campo magnético alterno de las MNPs esféricas de ca. 8.50 nm dopadas con manganeso, cobalto y zinc.

En la Figura 5.6 se muestra, a modo de ejemplo, el ajuste lineal llevado a cabo para determinar la pendiente en la curva de calentamiento de las MNPs esféricas sin dopaje. En la Tabla 5.3, por su parte, se presentan los valores de SAR obtenidos para cada sistema y estos mismos divididos entre el producto del cuadrado de la amplitud por la frecuencia del campo magnético alterno aplicado. En concordancia con varios estudios previos¹⁶, así como con los datos obtenidos de la capacidad hipotérmica de los nanocubos magnéticos del apartado anterior, los valores de SAR se expresaron de nuevo en vatios por unidad de masa de los elementos metálicos presentes en las partículas.

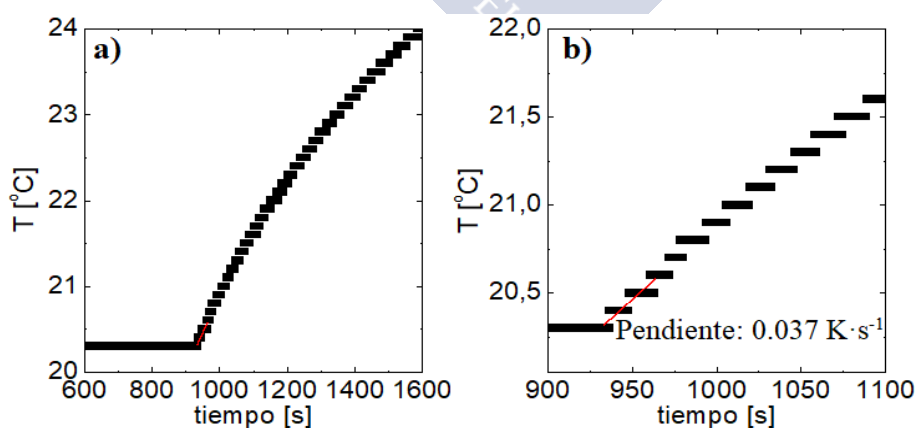


Figura 5.6: a) Ajuste lineal para la determinación de la pendiente de la curva de temperatura durante los primeros segundos de calentamiento en las MNPs esféricas sin dopar. b) Imagen aumentada de la gráfica anterior.

Tabla 5.3: Valores de SAR medidos en las MNPs esféricas de ca. 8.50 nm dopadas con cobalto, zinc y manganeso.

	Composición ICP-MS	C _{metal} [mg·ml ⁻¹]	dT/dt [K·s ⁻¹]	SAR [W·g _{met} ⁻¹]	SAR/(H ² ·f) [·10 ⁻³ pJ·m ² ·g ⁻¹ ·A ⁻²]
.	Fe ₃ O ₄	4.15	0.037	37.26 ± 0.31	151.7 ± 1.3
MN	Mn _{0.48} Fe _{2.52} O ₄	9.52	0.011	4.60 ± 0.11	18.73 ± 0.44
	Mn _{0.69} Fe _{2.31} O ₄	2.21	0.032	60.68 ± 0.88	247.0 ± 3.6
	Mn _{0.72} Fe _{2.28} O ₄	1.82	0.018	42.13 ± 0.50	171.5 ± 2.0
	Mn _{0.95} Fe _{2.05} O ₄	1.59	0.010	26.45 ± 0.56	107.7 ± 2.3
CO	Co _{0.12} Fe _{2.88} O ₄	1.41	0.029	86.1 ± 1.6	350.5 ± 6.5
	Co _{0.55} Fe _{2.45} O ₄	1.08	0.021	82.7 ± 1.1	336.7 ± 4.5
	Co _{0.79} Fe _{2.21} O ₄	2.35	0.010	17.33 ± 0.22	70.55 ± 0.90
	Co _{1.07} Fe _{1.93} O ₄	0.99	0.015	63.3 ± 1.0	257.7 ± 4.1
ZN	Zn _{0.63} Fe _{2.37} O ₄	1.21	0.005	17.51 ± 0.30	71.3 ± 1.2
MN-CO	Co _{0.28} Mn _{0.27} Fe _{2.45} O ₄	2.35	0.009	16.64 ± 0.90	67.7 ± 3.7
	Co _{0.29} Mn _{0.93} Fe _{1.78} O ₄	2.40	0.029	51.21 ± 0.38	208.5 ± 1.5
MN-ZN	Zn _{0.12} Mn _{0.26} Fe _{2.62} O ₄	1.46	0.026	73.9 ± 1.2	300.8 ± 4.9
	Zn _{0.15} Mn _{0.55} Fe _{2.30} O ₄	3.44	0.026	32.1 ± 1.1	130.7 ± 4.5
CO-ZN	Zn _{0.17} Co _{0.57} Fe _{2.26} O ₄	1.35	0.018	54.40 ± 0.75	221.4 ± 3.1
	Zn _{0.32} Co _{0.26} Fe _{2.42} O ₄	2.27	0.009	15.85 ± 0.98	64.5 ± 3.9
TRIPLE	Zn _{0.12} Co _{0.57} Mn _{0.21} Fe _{2.10} O ₄	2.05	0.009	19.31 ± 0.26	78.6 ± 1.1
	Zn _{0.25} Co _{0.29} Mn _{0.21} Fe _{2.25} O ₄	4.18	0.095	96.8 ± 1.5	394.1 ± 6.1
	Zn _{0.23} Co _{0.56} Mn _{0.08} Fe _{2.13} O ₄	0.77	0.008	41.27 ± 0.73	168.0 ± 3.0
	Zn _{0.14} Co _{0.50} Mn _{0.27} Fe _{2.09} O ₄	2.35	0.038	67.0 ± 1.2	272.7 ± 4.9
	Zn _{0.21} Co _{0.34} Mn _{0.24} Fe _{2.21} O ₄	2.36	0.030	52.9 ± 1.1	215.3 ± 4.5

En la Tabla 5.3 se puede observar que los valores de SAR obtenidos se encuentran, en su mayoría, en el orden de las decenas de vatios producidos por cada gramo de metal, alcanzando un valor máximo cercano a 100 W·g⁻¹. Al igual que sucedía con los nanocubos, no es sencillo establecer una comparación directa con los valores de SAR obtenidos en estudios previos, dado el muy amplio espectro de dopajes estudiado en nuestro caso y el papel clave que juegan un importante número de parámetros como

son, por ejemplo, el preciso tamaño de las MNPs o su recubrimiento. También dificulta la comparación, como se mencionó previamente, las numerosas formas reportadas de normalizar los resultados, pudiendo calcular el SAR en base a la concentración de MNPs de las disoluciones, a la concentración de elementos metálicos o, en algunos estudios, en base a la concentración de hierro exclusivamente. Estas dos últimas normalizaciones son coincidentes en el caso de estudiar MNPs de óxido de hierro, pero al introducir elementos dopantes debe considerarse, para establecer las comparaciones pertinentes, que los valores de SAR calculados respecto a la cantidad total de los elementos metálicos serán menores que los calculados exclusivamente con respecto a la cantidad de hierro. A pesar de estos inconvenientes, si se toman como referencia el valor medido de SAR en las MNPs sin dopar, así como dicho valor dividido entre el producto del cuadrado de la amplitud por la frecuencia del campo aplicado ($37.26 \text{ W} \cdot \text{g}^{-1}$ y $151.7 \cdot 10^{-3} \text{ pJ} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{A}^{-2}$) se puede comprobar que, dado el tamaño promedio de las mismas (8.80 nm) se trata de un valor ligeramente superior al obtenido por otros autores para MNPs de tamaños similares^{21,22}. Esto da pie a pensar que la metodología implementada para la síntesis de las presentes MNPs da lugar a unas nanoestructuras con un mayor grado de cristalinidad y pureza, lo cual posibilita que desarrollen una mayor potencia magnética en los ensayos de hipertermia. Asimismo, mediante la modificación con los diferentes elementos dopantes ensayados se consiguió prácticamente triplicar la capacidad hipotérmica de las MNPs manteniendo sus características de tamaño, morfología y monodispersidad.

A semejanza de cómo se ha procedido en Capítulos previos para el estudio comparativo de las propiedades magnéticas de los distintos tipos de MNPs, en esta ocasión también se llevó a cabo un análisis de la dependencia de los valores de SAR medidos con los grados de dopaje de las partículas y con las magnitudes características de los ciclos de histéresis de las mismas. Sin embargo, en primer lugar es necesario intentar establecer la dependencia del SAR con los tamaños de partícula dado que, a pesar de que se buscó sintetizar NPs de idénticas dimensiones, hay ciertas diferencias de hasta 2.50 nm de diámetro entre algunas de ellas. En este sentido, es relevante comentar que varios estudios previos realizados muestran que la dependencia del SAR con el tamaño de las MNPs es muy importante^{5,21}, notablemente mayor que la de otras magnitudes como las magnetizaciones de saturación o los campos coercitivos. Por ello, se comenzó analizando esta dependencia (ver Figura 5.7) a fin de concluir si se debe

excluir de nuestro estudio posterior alguno de las MNPs sintetizadas por presentar estas un tamaño excesivamente alejado del tamaño promedio.

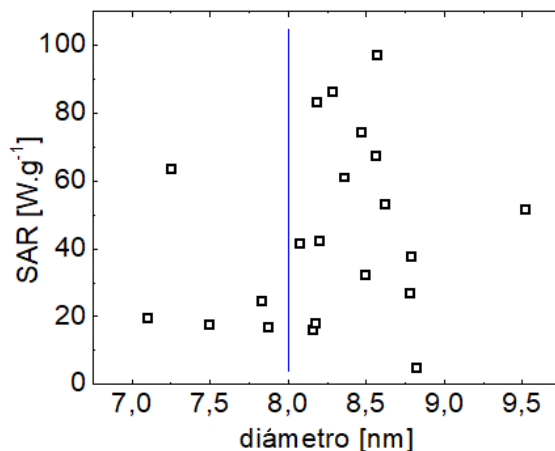


Figura 5.7: Valores de SAR frente al diámetro de las MNPs esféricas. Incertidumbre estimada máxima $\pm 4\%$.

Nótese, en primer lugar, que la Figura anterior no representa un estudio exhaustivo de la influencia del tamaño de las MNPs sobre el SAR, dado que para ello sería necesario que todas las partículas tuviesen la misma composición (de forma que los diferentes grados de dopaje no afectasen a la capacidad hipotérmica de las mismas). Sin embargo, a pesar de esto, sí se pueden extraer algunas conclusiones. Así, la más importante es el valor de SAR extremadamente pequeño que presentan las MNPs con un tamaño inferior a aproximadamente 8 nm. Por encima de este diámetro, las muestras tienen valores de SAR que varían en un amplio rango, consecuencia de sus diferentes composiciones. Sin embargo, a tamaños < 8 nm el SAR decae a valores mínimos para todas las MNPs independientemente de su composición, con la única excepción de aquellas con estequiometría $\text{Co}_{1.07}\text{Fe}_{1.93}\text{O}_4$, que presentan un SAR de $63.30\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$. De esta manera, se concluye que un diámetro de ca. 8 nm supone una suerte de tamaño crítico por debajo del cual la capacidad hipotérmica de los sistemas magnéticos sufre un fuerte descenso. Por ello, a pesar de que los resultados de SAR medidos no necesariamente han de ser incoherentes con la composición y características magnéticas de estas MNPs, excluirémos las mismas del análisis posterior para, de esta forma, intentar llevar a cabo un estudio de las ferritas dopadas en el que, tal y como se pretende desde un inicio, se excluya la influencia del tamaño.

De esta forma, una vez efectuado este primer análisis y descartadas las muestras con una muy reducida capacidad hipotérmica debida al pequeño tamaño de las nanopartículas, se estudió la influencia de la composición de las MNPs sobre su valor de SAR. Dado que anteriormente ya se habían estudiado de forma muy exhaustiva las dependencias de las magnetizaciones de saturación y de los campos coercitivos con la presencia de los tres elementos dopantes ensayados, también podemos utilizar este análisis previo para determinar la influencia del dopaje de los sistemas sobre el SAR en base a las características de los ciclos de histéresis magnética que estos presentan. En la Figura 5.8 se representa gráficamente como varía el SAR con el grado de dopaje con cada uno de los elementos de forma separada.

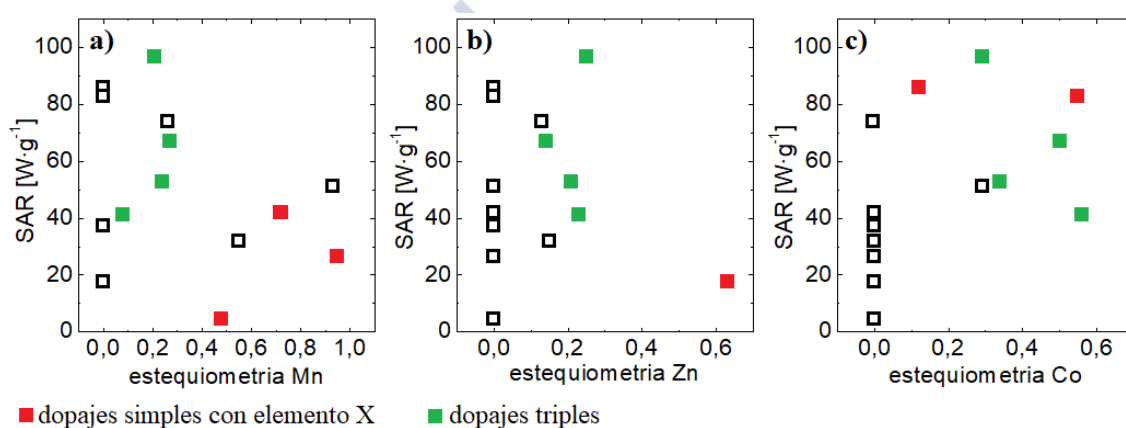


Figura 5.8: Variación del SAR frente a la estequiometría de los elementos dopantes en las MNPs: a) manganeso, b) zinc y c) cobalto. Incertidumbre estimada máxima $\pm 4\%$.

No resulta sencillo extraer conclusiones claras de las representaciones gráficas de los valores de SAR con respecto a las estequiometrías de los elementos dopantes. En ninguno de los tres casos se observa un patrón de comportamiento evidente debido, probablemente, a la existencia de numerosas muestras con dopajes dobles y triples, con las consecuentes influencias cruzadas de los distintos elementos, y a la fuerte dependencia del SAR con el tamaño, que da lugar a que leves modificaciones en este último parámetro debidas a pequeños fenómenos de agregación puedan provocar importantes variaciones entre las capacidades hipotérmicas de dos tipos de MNPs por lo demás semejantes.

Si nos centramos, en primer lugar, en los datos experimentales correspondientes a los dopajes simples con los diferentes elementos metálicos, se observa que las

presencias elevadas de zinc y manganeso no contribuyen positivamente a que las partículas presenten unos valores de SAR elevados, mientras que el dopaje con cobalto sí que da lugar a MNPs con capacidades hipotérmicas más elevadas. Cuando se intentan analizar todos los datos experimentales de forma conjunta la interpretación es más confusa, pudiendo sacar como principales conclusiones que la presencia elevada de manganeso, aunque sea combinada con otros dopantes, da lugar a NPs con bajo SAR (Figura 5.8a), y que los dopajes con cobalto, en cambio, dan lugar a MNPs con un SAR superior a aquellas que no incluyen este elemento en su estructura (Figura 5.8c). Los dopajes con zinc, por su parte, parecen dar lugar a generaciones de calor máximas cuando su estequiometría se encuentra por debajo de 0.30 (Figura 5.8b), teniendo en cuenta, en cualquier caso, la difícil interpretación de las gráficas debido a las diferentes combinaciones de elementos dopantes representadas en las mismas.

Dada la dificultad de establecer criterios de dependencia claros entre las estequiometrías de los elementos dopantes ensayados y los valores de SAR, a continuación se relacionaron estos últimos con las magnitudes características de los ciclos de histéresis de las MNPs, esto es, campos coercitivos y magnetizaciones de saturación, previamente medidos (Figura 5.9). A partir de estas representaciones gráficas se puede relacionar, desde otro punto de vista, el SAR con los grados de dopaje, dado que previamente ya se estableció de forma completa la dependencia de las características de los ciclos de histéresis con la mayor o menor presencia de manganeso, zinc y cobalto. Además, de esta manera se puede corroborar la relación existente entre el área de los ciclos de histéresis y la capacidad hipotérmica de las MNPs.

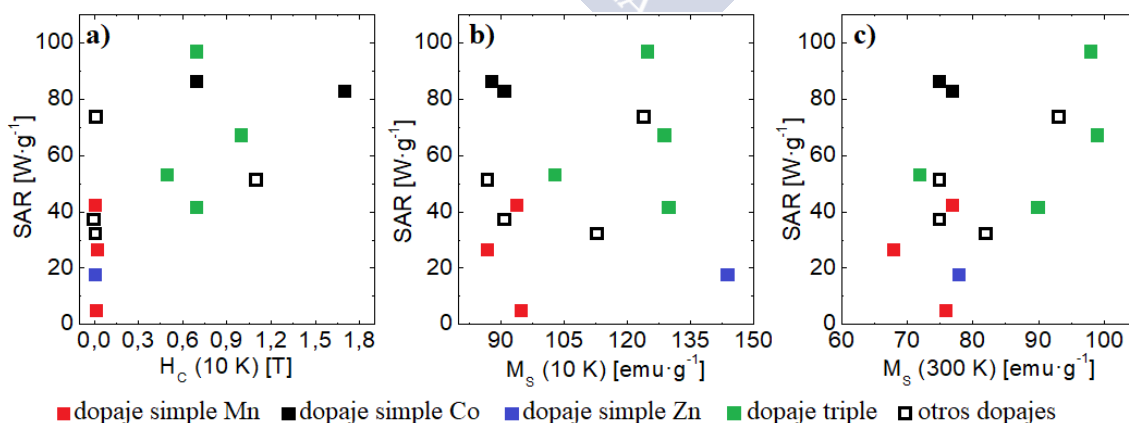


Figura 5.9: Dependencia del SAR en ferritas esféricas dopadas frente a: a) el campo coercitivo a 10 K, y las magnetizaciones de saturación a b) 10 K y c) 300 K. Incertidumbre estimada máxima $\pm 4\%$.

En este caso, aunque existen de nuevo varios datos experimentales que muestran una tendencia diferente a la de la mayoría, sí es posible extraer algunas conclusiones de forma más clara. Así, por ejemplo, en la Figura 5.9a se observa que, por lo general, aquellas MNPs que presentan un campo coercitivo prácticamente nulo a 10 K son las que muestran una menor capacidad hipotérmica. La principal excepción en este sentido son las MNPs de composición $\text{Zn}_{0.12}\text{Mn}_{0.26}\text{Fe}_{2.62}\text{O}_4$, que a pesar de su campo coercitivo muy bajo presentan un SAR de $73.9 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$, que se encuentra entre los más elevados. A campos coercitivos mayores, las MNPs ven incrementado su valor de SAR, observándose un aumento conjunto de ambas magnitudes. En cuanto a la dependencia del SAR con las magnetizaciones de saturación de los sistemas magnéticos a las dos temperaturas estudiadas (Figuras 5.9b-c) se observa, como tendencia general, el mismo comportamiento que el previamente explicado para el campo coercitivo, esto es, al aumentar estas magnitudes también aumenta el valor del SAR. Así, gran parte de las NPs con bajas saturaciones muestran una capacidad hipotérmica reducida, mientras que aquellas con valores grandes dan lugar a elevados SAR. La principal excepción a este comportamiento son las dos MNPs con dopajes simples con cobalto ($\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$) que, a pesar de sus magnetizaciones de saturación relativamente bajas, muestran unos valores de SAR que se encuentran entre los más elevados dentro del rango obtenido.

En base a las deducciones anteriores parece existir una relación entre la capacidad de generación de calor de las MNPs y el tamaño del ciclo de histéresis magnético que estas muestran a la temperatura de 10 K. A fin de comprobarlo de forma más directa, se analizó la variación de los valores de SAR con el producto del campo coercitivo por la magnetización de saturación de cada muestra (Figura 5.10). Estos productos, si bien no definen los tamaños de los ciclos de histéresis, sí sirven para ofrecer una idea muy aproximada de los mismos y de sus diferencias en las distintas MNPs sintetizadas.

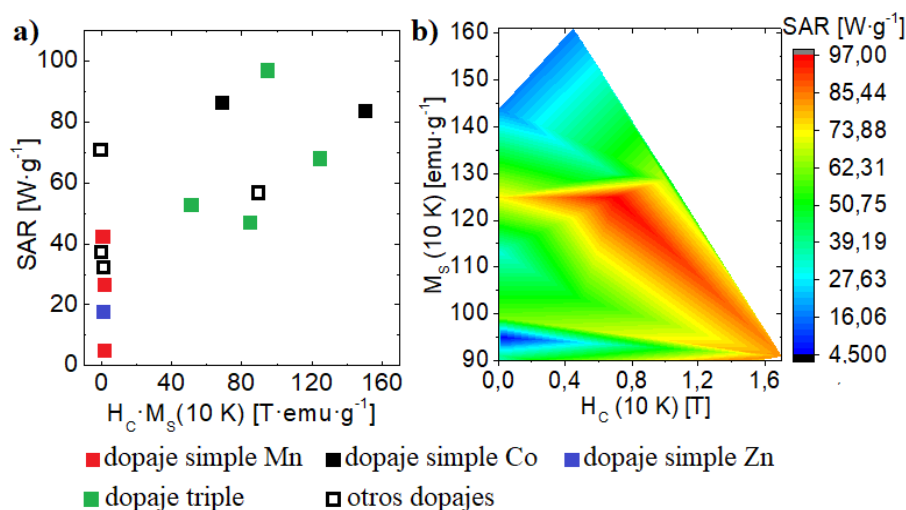


Figura 5.10: a) Variación del SAR en las ferritas esféricas dopadas frente al producto del campo coercitivo por la magnetización de saturación a 10 K; y b) mapa de color del SAR en función de del campo coercitivo y la magnetización de saturación a 10 K. Incertidumbre estimada máxima $\pm 4\%$.

La Figura 5.10a confirma la tendencia previamente comentada: la capacidad hipotérmica de las MNPs esféricas se incrementa a medida que aumenta el área del ciclo de histéresis a bajas temperaturas de las nanopartículas. Aquellas que presentan un área del ciclo de histéresis casi nula son las que tienen asociado unos valores de SAR más pequeños. A medida que dicha área se incrementa hay una tendencia manifiesta al incremento simultáneo del SAR. Nótese que las dos MNPs en los que el valor de SAR medido fue más elevado, las de composiciones $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$, no son aquellas que poseen los ciclos de histéresis de mayor área, si bien sí que presentan unos valores tanto de magnetización de saturación como de campo coercitivo medios-altos dentro del rango obtenido. El mapa de color de la Figura 5.10b confirma este comportamiento, alcanzándose las mayores capacidades hipotérmicas a valores combinados de alta saturación y, especialmente, alto campo coercitivo.

Esta última conclusión puede ser utilizada, en base al estudio exhaustivo realizado previamente sobre la relación entre los ciclos de histéresis y los grados de dopaje, para estimar la composición de las MNPs necesaria para que estas desarrollen una mayor capacidad como agentes hipotérmicos. En páginas anteriores se concluyó que los dopajes medios-altos en cobalto daban lugar a campos coercitivos elevados, mientras que los dopajes en zinc que daban lugar a estequiometrías de ca. 0.30

generaban partículas con altas magnetizaciones de saturación. La influencia del manganeso se determinó como menor, observándose una ligera contribución negativa a las magnetizaciones de saturación. Así pues, las MNPs con áreas de los ciclos de histéresis grandes a baja temperatura son aquellas con una estequiometría elevada en cobalto combinada con una de zinc en el intervalo antes indicado, y combinándose estas, además, con una presencia de manganeso reducida. De esta forma, dada la relación de proporcionalidad que fue establecida entre el área de los ciclos de histéresis y el SAR, se concluye que los grados de dopajes con manganeso, cobalto y zinc antes comentados son los que dan lugar a MNPs con mayor capacidad de generación de calor bajo un campo magnético alterno aplicado. Se puede observar, por ejemplo, que las MNPs sintetizadas en las que se midió un valor más grande de SAR fueron las de composición $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ ($96.8 \pm 1.5 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$), pudiendo comprobarse que las presencias de los tres elementos dopantes concuerdan en gran medida con las conclusiones antes efectuadas. Algunas otras MNPs, como las de composición $\text{Zn}_{0.14}\text{Co}_{0.50}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$ ($67.0 \pm 1.2 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$), $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$ ($82.7 \pm 1.1 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$) o $\text{Zn}_{0.17}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.27}\text{Fe}_{2.09}\text{O}_4$ ($54.40 \pm 0.75 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$), que también cumplen una o varias de las condiciones de dopaje establecidas como óptimas, se encuentran entre las que presentan unos valores de SAR más elevados.

Nótese, como también se ha comentado, que el SAR de las MNPs es una magnitud que guarda una dependencia más fuerte con el tamaño de las mismas que con los parámetros característicos del ciclo de histéresis. Esto puede ocasionar que pequeñas variaciones en las dimensiones de las MNPs, debidas por ejemplo a pequeños fenómenos de agregación al ser transferidas a medio acuoso, den lugar a que sistemas de composición no óptima en base a las deducciones efectuadas previamente presenten importantes valores de SAR o viceversa.

5.2.1.3. Discusión comparativa de la capacidad hipotérmica de las MNPs de forma cúbica y esférica

Las medidas efectuadas han servido para constatar importantes diferencias de comportamiento en lo que a la capacidad hipotérmica se refiere entre las MNPs de forma cúbica de ca. 30 y 40 nm y las de forma esférica de ca. 8.50 nm. En primer lugar, los nanocubos mostraron unos valores de SAR notablemente más elevados que las

ferritas esféricas, siendo los valores máximos de 1675 y 96.8 $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Esta diferencia es aún más importante si se considera la normalización teniendo en cuenta las distintas características de los campos magnéticos alternos aplicados en cada caso, es decir, si se dividen los valores de SAR entre el producto de la frecuencia por el cuadrado de la amplitud, en cuyo caso el valor máximo medido en las MNPs cúbicas y esféricas fue de 10.81 y 0.39 $\text{pJ}\cdot\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{A}^{-2}$, respectivamente (Figura 5.11). La mayor capacidad hipotérmica de los nanocubos reside, por una parte, en su morfología que, al contrario de lo que sucede en las MNPs de forma esférica, permite mantener la simetría de coordinación de la red cristalina en la superficie de las MNPs, lo cual se traduce en un mayor número de momentos magnéticos alineados según el campo externo aplicado²³. Sin embargo, el motivo fundamental radica en su mayor tamaño, magnitud que juega un papel fundamental en la determinación de los valores de SAR. De esta forma, las diferentes dimensiones de las MNPs cúbicas y las MNPs esféricas (30 y 40 frente a 8.50 nm) justifican las importantes diferencias en dicha magnitud para ambos tipos de sistemas. Este efecto del tamaño también se confirma al observar las diferencias en el SAR de los nanocubos de ca. 30 nm y los de ca. 40 nm, notablemente superior en estos últimos.

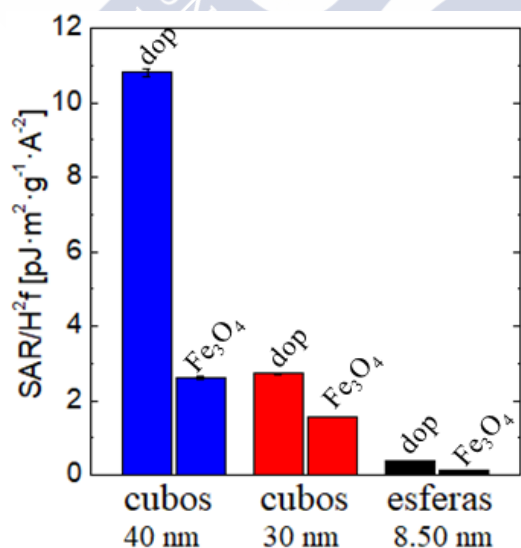


Figura 5.11: Representación gráfica comparativa de los valores de SAR normalizados obtenidos en las nanoesferas de ca. 8.50 nm y en los nanocubos de ca. 30 y 40 nm (valores de las MNPs sin dopaje y valores máximos al introducir los dopajes).

Otro factor que explica el mayor SAR de los nanocubos es su carácter ferrimagnético, consecuencia de su tamaño más grande. Este da lugar a que las curvas de magnetización frente al campo magnético continuo aplicado muestren unos ciclos de histéresis de área no nula a temperatura ambiente, lo cual se traduce en una contribución a su capacidad de generación de calor²⁴. Esto no sucede en las MNPs de forma esférica que, dado su reducido tamaño y su consecuente comportamiento superparamagnético, presentan ciclos de histéresis de área despreciable a temperatura ambiente bajo campos magnéticos continuos²⁵. Como ya se ha comentado en la Introducción de la presente Tesis, en muchas aplicaciones biomédicas, como las llevadas a cabo por Meikle *et al.*²⁶ o Karimzadeh *et al.*²⁷, es común optar por las MNPs superparamagnéticas, a pesar de presentar estas valores de SAR inferiores a las ferri- o ferromagnéticas. Esta elección obedece a la tendencia de estas últimas a formar agregados debido a sus valores no nulos de magnetización remanente. Sin embargo, los nanocubos sintetizados en el presente estudio presentan unas dimensiones sólo ligeramente por encima del tamaño crítico entre los regímenes superparamagnético y ferrimagnético, lo cual da lugar a que presenten unos ciclos de histéresis a temperatura ambiente de área reducida y, por tanto, una baja tendencia a la agregación, lo cual fue corroborado a través de los estudios de estabilidad en diferentes medios biológicos. Por lo tanto, debe concluirse que las MNPs cúbicas muestran un mayor potencial de cara a su uso en aplicación clínica en el campo de la hipertermia magnética.

Por otra parte, también se han constatado diferencias en las influencias de los dopajes sobre los valores de SAR de las MNPs cúbicas y las esféricas. En estas últimas se estableció una relación de incremento simultáneo del SAR con las magnetizaciones de saturación y los campos coercitivos medidos a baja temperatura, es decir, las MNPs con áreas más grandes en sus ciclos de histéresis fueron aquellas que mostraron una mayor capacidad hipertérmica. A efectos del dopaje esto se traduce, como ya fue explicado, en que las MNPs esféricas con proporciones importantes de cobalto y con zinc en una estequiometría de ca. 0.30 son las que deparan un mayor SAR, estableciéndose la influencia del manganeso como menor, salvo que este sea incorporado en elevado porcentaje, en cuyo caso tiende a disminuir la capacidad hipertérmica de las MNPs esféricas.

En el caso de las MNPs cúbicas se estableció la misma relación de aumento simultáneo del SAR y las magnetizaciones de saturación. Sin embargo, se constató que,

al contrario que en las MNPs esféricas, los elevados campos coercitivos no dan lugar a valores de SAR elevados sino todo lo contrario, de modo que para estas MNPs no se pudo establecer ninguna relación entre la capacidad hipotérmica y el área de los ciclos de histéresis. Además, las características de los ciclos de histéresis antes mencionadas implican unos grados de dopaje óptimos de aproximadamente 0.30 para zinc e inferior a 0.15-0.20 para cobalto de cara a lograr los máximos valores de SAR.

Hay que tener en cuenta que, a pesar de que las pérdidas por histéresis suponen el mecanismo más importante de generación de calor por parte de las MNPs, la relación entre el SAR y los ciclos de histéresis obtenidos en los Capítulos previos no ha de ser necesariamente directa. En primer lugar, por la existencia de otros fenómenos de generación de calor, principalmente los mecanismos de relajación de Néel y de Brown; en segundo lugar, porque los ciclos de histéresis fueron medidos bajo campos magnéticos aplicados de carácter continuo y de amplitudes elevadas para así poder determinar con precisión las magnetizaciones de saturación de las distintas MNPs. Los campos magnéticos aplicados en los estudios de hipertermia, en cambio, son alternos y de amplitud muy reducida, de modo que los ciclos de histéresis que realmente experimentarán las partículas serán en realidad diferentes. La comparación entre los valores de SAR y los ciclos de histéresis determinados en Capítulos anteriores se ha llevado a cabo dado que se espera una cierta relación de proporcionalidad entre los ciclos que las partículas experimentan bajo campos continuos y alternos.

De este modo, se comprobó que las MNPs esféricas de tamaño reducido presentan unos valores de SAR con un alto grado de proporcionalidad con el área de los ciclos de histéresis determinados, confirmándose estas pérdidas por histéresis como el principal mecanismo de generación de calor. En las MNPs cúbicas de mayor tamaño, sin embargo, esta relación no se cumple, siendo alterada principalmente por los nanocubos dopados a elevados porcentajes de cobalto, que presentan unas altas coercitividades y, por tanto, unos ciclos de histéresis grandes a pesar de sus bajas saturaciones. Precisamente, esta peculiar forma de los ciclos de histéresis, muy anchos y de poca altura, puede ser la causa de los bajos valores de SAR de estas MNPs. A campos magnéticos bajos el incremento de su magnetización será muy escaso, dando lugar a unos ciclos menores de área reducida que pueden ser la causa de su pequeña capacidad de generación de calor. Debe tenerse en cuenta, además, que en estas MNPs de mayor tamaño la generación de calor debido a la rotación física de las MNPs

(Brown) cobra una mayor importancia²⁸ afectando a la relación de proporcionalidad entre SAR y área de los ciclos de histéresis.

5.2.1.4. Medidas de la relajación transversal de las MNPs de forma cúbica

En esta sección se determinaron los coeficientes de relajación transversal (r_2) de MNPs con morfología cúbica transferidas a medio acuoso mediante su recubrimiento polimérico, cuya preparación ya fue detallada en el Capítulo 2. Para ello, se seleccionaron varias muestras que permitieran analizar de forma preliminar la influencia del tamaño y de los diferentes tipos de dopaje sobre la potencial capacidad de estos nanosistemas magnéticos como agentes de contraste MRI. De esta forma, se estudiaron nanocubos de ca. 40 nm de magnetita, así como otros dopados con cobalto y zinc con diferentes grados de sustitución (dos muestras con cada tipo de dopaje). Además, también se analizaron unos nanocubos de ca. 30 nm dopados con manganeso.

Como se mencionó en la Introducción de la presente Tesis, las estructuras magnéticas en forma de nanopartículas pueden ser usadas tanto como agentes de contraste en T_1 como en T_2 para la obtención de imágenes mejoradas mediante la técnica de MRI; no obstante, la mayoría de estudios y análisis previos realizados indican que es actuando como agentes de contraste en T_2 donde suponen una manifiesta mejoría sobre los agentes de contraste tradicionales^{10,11}. Es, por ello, que en este estudio solo se determinarán los coeficientes de relajación transversal (r_2) de las MNPs, ya que los valores de r_1 dados los tamaños, estructura y composición de las partículas se estiman como muy reducidos. En particular, r_2 representa una medida del tiempo que tardan las MNPs en perder la magnetización transversal adquirida tras la aplicación momentánea de un campo magnético externo perpendicular a uno longitudinal presente desde un inicio. Cuanto menor sea este tiempo de relajación mayor será el coeficiente r_2 , y mejor será la eficacia del contraste negativo proporcionado por las MNPs²⁹.

El coeficiente de relajación r_2 , que es el indicador de la mejora de contraste, se obtiene calculando la pendiente de la curva de ajuste de la tasa de relajación transversal ($R_2 = T_2^{-1}$) frente a la concentración molar del agente de contraste⁹. Para tal fin se midieron, para cada muestra, los tiempos de relajación transversales a varias concentraciones de MNPs diferentes, obteniendo puntos experimentales suficientes para

la realización de un ajuste lineal a partir del cual obtener la magnitud buscada. De igual forma que se procedió anteriormente para el estudio del SAR, se utilizarán las concentraciones de los elementos metálicos presentes en las muestras, determinadas mediante ICP-MS, de forma que los valores de r_2 calculados estarán normalizados según la cantidad de hierro, cobalto, manganeso y zinc de las distintas MNPs.

En la Tabla 5.4 se muestran los inversos de los tiempos de relajación transversales medidos a cada una de las concentraciones de nanocubos preparadas.

Tabla 5.4: Valores de los inversos de los tiempos de relajación transversal medidos para cada concentración en los nanocubos estudiados.

Composición ICP-MS	Tamaño [nm]					
Fe ₃ O ₄	41.1 ± 3.1	C _{met} [mM]	0.25	0.50	1.00	-
		R ₂ [s ⁻¹]	31.40	55.71	88.11	-
Co _{0.17} Fe _{2.83} O ₄	40.6 ± 2.6	C _{met} [mM]	0.10	0.25	0.50	0.60
		R ₂ [s ⁻¹]	17.01	29.16	37.26	38.26
Co _{0.78} Fe _{2.22} O ₄	45.7 ± 4.3	C _{met} [mM]	0.10	0.25	0.50	-
		R ₂ [s ⁻¹]	5.71	13.11	154.3	-
Zn _{0.21} Fe _{2.79} O ₄	39.3 ± 2.4	C _{met} [mM]	0.10	0.25	0.50	0.75
		R ₂ [s ⁻¹]	35.77	66.05	77.52	108.2
Zn _{0.43} Fe _{2.57} O ₄	40.2 ± 3.0	C _{met} [mM]	0.10	0.25	0.60	1.00
		R ₂ [s ⁻¹]	26.57	57.64	88.89	246.9
Mn _{0.05} Fe _{2.95} O ₄	28.0 ± 3.1	C _{met} [mM]	0.10	0.25	0.50	-
		R ₂ [s ⁻¹]	19.89	47.67	149.9	-

Como se comentó previamente, a partir de los datos de la tabla anterior se pueden hacer los correspondientes ajustes lineales de las tasas de relajación transversales frente a la concentración molar de las disoluciones de MNPs, dando como resultado unas rectas de ajuste cuyas pendientes se corresponderán con los coeficientes r_2 respectivos. En la Figura 5.12 se representa, a modo de ejemplo, el ajuste lineal llevado a cabo para la obtención del valor de r_2 en el sistema de nanocubos de ca. 40 nm

y composición $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$, mientras que en la Tabla 5.5 se muestran los valores de dicha magnitud obtenidos para cada sistema de MNPs cúbicas estudiado.

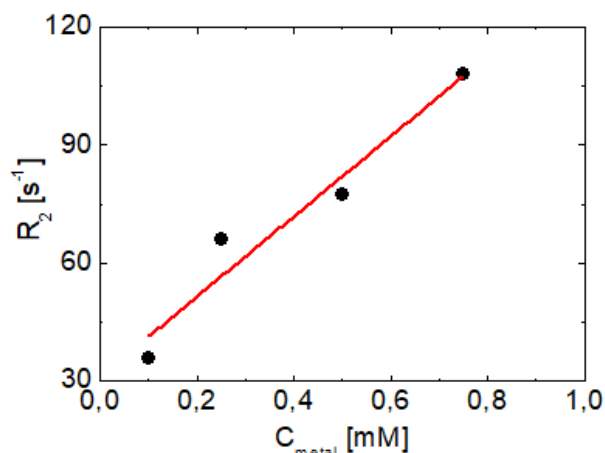


Figura 5.12: Tasas de relajación transversales frente a concentración de las disoluciones de nanocubos $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ y ajuste lineal. Incertidumbre estimada máxima $\pm 8\%$.

Tabla 5.5: Valores de los coeficientes de relajación r_2 de los sistemas de nanocubos.

Composición ICP-MS	Tamaño [nm]	r_2 [$\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
Fe_3O_4	41.1 ± 3.1	74.1 ± 9.9
$\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$	40.6 ± 2.6	35.9 ± 6.9
$\text{Co}_{0.78}\text{Fe}_{2.22}\text{O}_4$	45.7 ± 4.3	391 ± 33
$\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$	39.3 ± 2.4	102 ± 12
$\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$	40.2 ± 3.0	234 ± 27
$\text{Mn}_{0.05}\text{Fe}_{2.95}\text{O}_4$	28.0 ± 3.1	334 ± 39

Se observa que los diferentes sistemas de nanocubos estudiados presentan coeficientes de relajación transversales que varían en un amplio rango, que va desde un valor mínimo de $35.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en los nanocubos de ca. 40 nm de composición $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$ hasta un máximo de $391 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en los de ca. 40 nm y composición $\text{Co}_{0.78}\text{Fe}_{2.22}\text{O}_4$. Al igual que sucedía con los resultados obtenidos referentes de la capacidad hipotérmica de las MNPs, resulta complicado efectuar comparaciones entre los valores de r_2 aquí medidos y los obtenidos en diferentes estudios previos, dadas las singulares características de morfología, tamaño, composición y recubrimiento de

nuestros nanocubos; así como debido a las normalizaciones de las concentraciones y características del campo magnético aplicado, que no son siempre especificadas. No obstante, cabe mencionar, por ejemplo, que Lee *et al.*³⁰ o Cheong *et al.*³¹ sintetizaron MNPs de magnetita con tamaños de 58 y 87 nm, dando lugar estas a coeficientes de relajación de r_2 de 324 y 397 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente. Por ello, se concluye que los máximos valores de r_2 medidos en los sistemas de nanocubos estudiados en este trabajo se encuentran dentro del orden de magnitud esperado, siendo si acaso más elevados que los de MNPs de similares dimensiones.

Es importante tener en cuenta que para la determinación de los coeficientes de relajación los nanosistemas magnéticos deben ser sometidos a campos externos de muy elevada intensidad, de hasta 1.5 T. En el caso de MNPs como las estudiadas, de tamaños superiores a 40 nm y en régimen ferrimagnético, este tipo de campos pueden dar lugar a fenómenos de agregación en caso de que el recubrimiento superficial de las MNPs no prevenga de forma altamente eficiente las interacciones dipolares entre las mismas. Esta puede ser la causa que explique los muy diferentes valores de r_2 obtenidos. El hecho de que los únicos nanocubos de ca. 30 nm estudiados fuesen unos de los que diesen lugar a un valor de r_2 más elevado refrenda esta suposición previa, dado que sería esperable, en base a distintos trabajos previos^{32,33,34}, que el coeficiente de relajación transversal de las MNPs aumentase con su tamaño. Así, es posible que estos nanocubos de menor tamaño se viesen menos afectados por fenómenos de agregación, con la consecuente precipitación y pérdida de material magnético, al aplicar el campo externo, midiéndose de este modo un mayor coeficiente de relajación r_2 en este sistema.

Por otro lado, las diferentes composiciones y características magnéticas de las MNPs juegan también un importante papel; sin embargo, su rol exacto no se puede establecer con claridad, dado el reducido número de muestras que fueron estudiadas. A pesar de ello, si puede deducirse que los dopajes elevados con zinc y, especialmente, cobalto, parecen promover la obtención de elevados coeficientes r_2 . Asimismo, la muestra dopada con manganeso, si bien en este caso no se estudió ningún otro sistema con su mismo tamaño de partículas de ca. 30 nm para establecer una comparación, también parece indicar que pequeños dopajes con este elemento favorecen una rápida relajación transversal. Observando las características magnéticas de estas muestras, previamente determinadas en el Capítulo 2, parece que aquellas con bajas saturaciones y elevadas coercitividades son las que muestran un mayor potencial como agentes de

contraste MRI negativos, si bien como se mencionó con anterioridad deben estudiarse más sistemas para establecer esta relación de forma más clara.

De este modo, las medidas de relajación efectuadas a las MNPs de morfología cúbica parecen mostrar un excelente potencial de los sistemas magnéticos como agentes de contraste negativos para la obtención de imágenes por MRI. Sin embargo, las importantes diferencias entre los distintos nanocubos de ca. 40 nm estudiados, así como el valor anormalmente reducido del coeficiente r_2 en alguno de ellos y el hecho de que los únicos nanocubos de ca. 30 nm estudiados muestren un muy elevado r_2 dan pie a pensar en la existencia de fenómenos de agregación y precipitación en algunos de los sistemas de nanocubos de mayor tamaño, fenómeno que debe ser corregido mediante modificaciones en el protocolo de recubrimiento polimérico. Por otra parte, el bajo número de muestras estudiadas no permite establecer un criterio de dependencia de la relajación con el grado de dopaje, si bien el muy elevado valor de r_2 medido en una de las muestras dopada con una elevada cantidad de cobalto parece indicar que la presencia de este elemento da lugar a sistemas con elevados coeficientes de relajación transversal.

5.2.1.5. Medidas de la relajación transversal de las MNPs de forma esférica

En este apartado, se midieron las relajaciones transversales de todas las MNPs con diferentes grados de dopaje con cobalto, zinc y manganeso de ca. 8.50 nm de diámetro sintetizadas en el Capítulo 3. Como ya fue comentado, a pesar de que también pueden ser empleados como agentes de contraste en T_1 , es como agentes de contraste en T_2 dónde este tipo de nanosistemas acostumbran ofrecer una mejora más significativa con respecto a los agentes de contraste tradicionales^{10,11}. Este es el motivo por el cual, de igual forma que se procedió en el estudio de las MNPs cúbicas en el apartado previo, solo se determinarán los coeficientes de relajación transversales de los sistemas (r_2).

Para su cálculo, se midieron los tiempos de relajación transversales de cada tipo de MNPs a varias concentraciones diferentes, usando la recta del ajuste lineal de estas magnitudes para la determinación del coeficiente buscado. De igual forma que se procedió en todos los apartados anteriores de este capítulo, se utilizarán las concentraciones de los elementos metálicos presentes en las muestras, previamente determinadas mediante ICP-MS, para la normalización de los valores de r_2 . Los datos de

las tasas de relajación obtenidos para cada sistema a las diferentes concentraciones ensayadas se muestran en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6: Valores de los inversos de los tiempos de relajación transversal medidos para cada concentración en las MNPs estudiadas.

No dop	C_{met} [mM]	0.75	0.45	0.30	0.15	Zn_{0.63}	C_{met} [mM]	0.32	0.19	0.13	0.06
	R₂ [s⁻¹]	58.8	43.5	34.5	23.8		R₂ [s⁻¹]	26.3	18.9	14.3	8.3
Mn_{0.48}	C_{met} [mM]	0.86	0.52	0.34	0.18	Mn_{0.69}	C_{met} [mM]	0.40	0.24	0.16	0.08
	R₂ [s⁻¹]	20.4	13.5	9.1	5.6		R₂ [s⁻¹]	20.4	13.3	9.0	5.6
Mn_{0.72}	C_{met} [mM]	0.33	0.20	0.13	0.07	Mn_{0.95}	C_{met} [mM]	0.29	0.17	0.11	0.06
	R₂ [s⁻¹]	24.4	14.9	11.1	6.1		R₂ [s⁻¹]	21.3	10.6	7.9	5.0
Co_{0.12}	C_{met} [mM]	0.43	0.26	0.17	0.09	Co_{0.55}	C_{met} [mM]	0.19	0.12	0.08	0.04
	R₂ [s⁻¹]	50.0	30.3	21.7	10.1		R₂ [s⁻¹]	12.8	7.1	5.3	3.3
Co_{0.79}	C_{met} [mM]	0.35	0.21	0.14	0.07	Co_{1.07}	C_{met} [mM]	0.17	0.10	0.07	0.04
	R₂ [s⁻¹]	26.3	18.9	14.3	8.4		R₂ [s⁻¹]	12.0	7.3	5.3	3.4
Mn_{0.26} Zn_{0.12}	C_{met} [mM]	0.26	0.16	0.11	0.05	Mn_{0.55} Zn_{0.15}	C_{met} [mM]	0.82	0.49	0.33	0.16
	R₂ [s⁻¹]	18.9	12.0	8.9	5.2		R₂ [s⁻¹]	58.8	45.5	37.0	24.4
Mn_{0.27} Co_{0.28}	C_{met} [mM]	0.47	0.28	0.19	0.09	Mn_{0.93} Co_{0.29}	C_{met} [mM]	0.43	0.26	0.17	0.09
	R₂ [s⁻¹]	43.5	29.4	23.3	15.2		R₂ [s⁻¹]	45.5	30.3	22.7	12.8
Co_{0.26} Zn_{0.32}	C_{met} [mM]	0.40	0.24	0.16	0.08	Co_{0.57} Zn_{0.17}	C_{met} [mM]	0.51	0.31	0.20	0.10
	R₂ [s⁻¹]	43.5	29.4	23.3	15.2		R₂ [s⁻¹]	34.5	22.7	16.7	9.0
Mn_{0.21} Co_{0.57} Zn_{0.12}	C_{met} [mM]	0.36	0.22	0.14	0.07	Mn_{0.24} Co_{0.34} Zn_{0.21}	C_{met} [mM]	0.59	0.35	0.24	0.12
	R₂ [s⁻¹]	41.7	23.8	16.9	12.2		R₂ [s⁻¹]	62.5	38.5	2.5	16.1
Mn_{0.27} Co_{0.50} Zn_{0.14}	C_{met} [mM]	0.56	0.34	0.23	0.11	Mn_{0.08} Co_{0.56} Zn_{0.23}	C_{met} [mM]	0.24	0.14	0.10	0.05
	R₂ [s⁻¹]	62.5	37.0	35.7	25.0		R₂ [s⁻¹]	15.6	9.7	7.1	4.1
Mn_{0.21} Co_{0.29} Zn_{0.25}	C_{met} [mM]	0.37	0.22	0.15	0.07						
	R₂ [s⁻¹]	45.5	30.3	22.2	13.0						

Como se comentó anteriormente, a partir de los datos de la Tabla anterior es posible efectuar un ajuste lineal de los inversos de los tiempos de relajación frente a la concentración de MNPs para cada sistema, y la pendiente de la recta del ajuste resultante se corresponderá con el valor del coeficiente de relajación transversal, r_2 . Se efectuó este procedimiento para cada uno de las partículas sintetizadas,

representándose dos de ellos en la Figura 5.13 a modo de ejemplo. En la Tabla 5.7 se muestran los valores de r_2 de cada conjunto de MNPs.

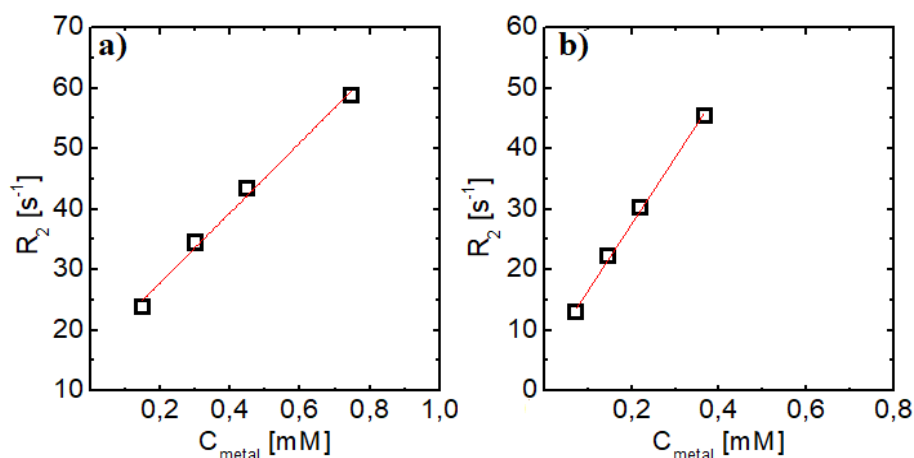


Figura 5.13: Inversos de los tiempos de relajación transversales frente a la concentración metálica de las disoluciones de MNPs de composición a) Fe_3O_4 , y b) $Zn_{0.25}Co_{0.29}Mn_{0.21}Fe_{2.25}O_4$ y ajustes lineales correspondientes. Incertidumbre estimada máxima $\pm 6\%$.

Tabla 5.7: Valores de los coeficientes de relajación r_2 determinados en cada uno de los sistemas de MNPs de ca. 8.50 nm.

	Composición ICP-MS	r_2 [mM $^{-1}$ ·s $^{-1}$]		Composición ICP-MS	r_2 [mM $^{-1}$ ·s $^{-1}$]
.	Fe_3O_4	57.8 ± 3.2		$Zn_{0.12}Mn_{0.26}Fe_{2.62}O_4$	64.9 ± 1.1
MN	$Mn_{0.48}Fe_{2.52}O_4$	21.0 ± 1.0	MN-ZN	$Zn_{0.15}Mn_{0.55}Fe_{2.30}O_4$	51.1 ± 5.7
	$Mn_{0.69}Fe_{2.31}O_4$	47.1 ± 1.3	CO-ZN	$Zn_{0.17}Co_{0.57}Fe_{2.26}O_4$	61.9 ± 2.7
	$Mn_{0.72}Fe_{2.28}O_4$	69.1 ± 1.9		$Zn_{0.32}Co_{0.26}Fe_{2.42}O_4$	88.1 ± 2.5
	$Mn_{0.95}Fe_{2.05}O_4$	71.8 ± 8.6	TRIPLE	$Zn_{0.12}Co_{0.57}Mn_{0.21}Fe_{2.10}O_4$	104.3 ± 9.5
	$Co_{0.12}Fe_{2.88}O_4$	114.2 ± 3.7		$Zn_{0.25}Co_{0.29}Mn_{0.21}Fe_{2.25}O_4$	109.0 ± 3.0
CO	$Co_{0.55}Fe_{2.45}O_4$	62.5 ± 4.9		$Zn_{0.23}Co_{0.56}Mn_{0.08}Fe_{2.13}O_4$	59.8 ± 1.0
	$Co_{0.79}Fe_{2.21}O_4$	62.0 ± 4.0		$Zn_{0.14}Co_{0.50}Mn_{0.27}Fe_{2.09}O_4$	82.1 ± 3.0
	$Co_{1.07}Fe_{1.93}O_4$	62.2 ± 2.5		$Zn_{0.21}Co_{0.34}Mn_{0.24}Fe_{2.21}O_4$	98.2 ± 2.1
	ZN	$Zn_{0.63}Fe_{2.37}O_4$	70.4 ± 5.8		

Los diferentes sistemas de MNPs presentan, por lo general, un valor de r_2 de varias decenas de $mM^{-1} \cdot s^{-1}$, llegando a alcanzarse en varias de las muestras valores

superiores a $100 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. De esta forma, la totalidad de las partículas estudiadas se muestran como potenciales agentes de contraste negativos mucho más efectivos que los agentes de contraste más tradicionales, basados típicamente en compuestos de gadolinio^{35,36}, cuyos coeficientes de relajación transversal no acostumbran a superar los $6\text{-}8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Asimismo, varias de las nanoestructuras sintetizadas también presentan valores mejorados con respecto a algunos de los agentes de contraste basados en sistemas magnéticos disponibles comercialmente³⁷, como pueden ser Ferumoxtran-10® o Feridex®, cuyos coeficiente de relajación transversal son de ca. 60 y $98 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente. Por su parte, si se comparan los valores de r_2 medidos en nuestros sistemas con los de estructuras magnéticas de similares características estudiadas en trabajos previos, se comprueba que algunas de nuestras MNPs muestran un excelente potencial como agentes de contrastes negativos, ya que habitualmente los coeficientes de relajación medidos en MNPs de ca. 8-9 nm de diámetro no suelen superar los $100 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, algo que sí sucede para algunas de las partículas sintetizadas en este trabajo^{11,33}. Además, también se corrobora que los distintos dopajes ensayados sirven, en algunos casos, para aumentar de forma importante el coeficiente r_2 , pasando de un valor de $57.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ en las MNPs de óxido de hierro sin dopar a valores superiores a $110 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ en las dopadas.

A continuación, se efectuó un estudio sobre la relación entre los valores de r_2 medidos y las características de las MNPs. Comenzaremos, a semejanza de cómo procedimos en el estudio del SAR de estas mismas MNPs, por analizar la relación entre el coeficiente de relajación transversal y el tamaño de estas (Figura 5.14).

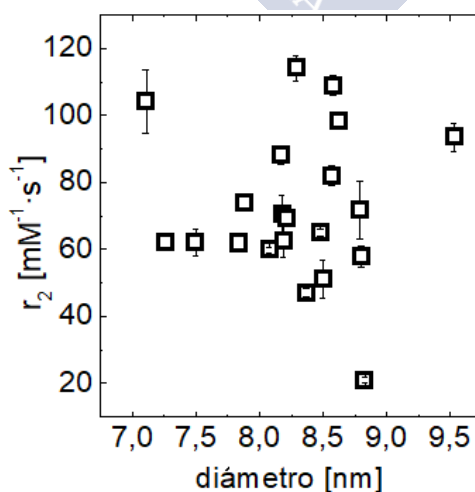


Figura 5.14: Valores de r_2 en función del diámetro de las MNPs esféricas.

Se puede observar que la dependencia de r_2 con el tamaño de las MNPs es menos clara que la observada en el estudio del SAR efectuado anteriormente. En el caso de r_2 , si bien la gran mayoría de los valores máximos obtenidos corresponden a partículas con un tamaño promedio elevado dentro del rango obtenido, las diferencias no son tan significativas como para descartar de antemano ninguna de las MNPs por sus dimensiones. Así, a continuación se representan directamente tanto la dependencia de r_2 con las estequiometrías de los elementos dopantes de las NPs como con las características de los ciclos de histéresis (Figura 5.15).

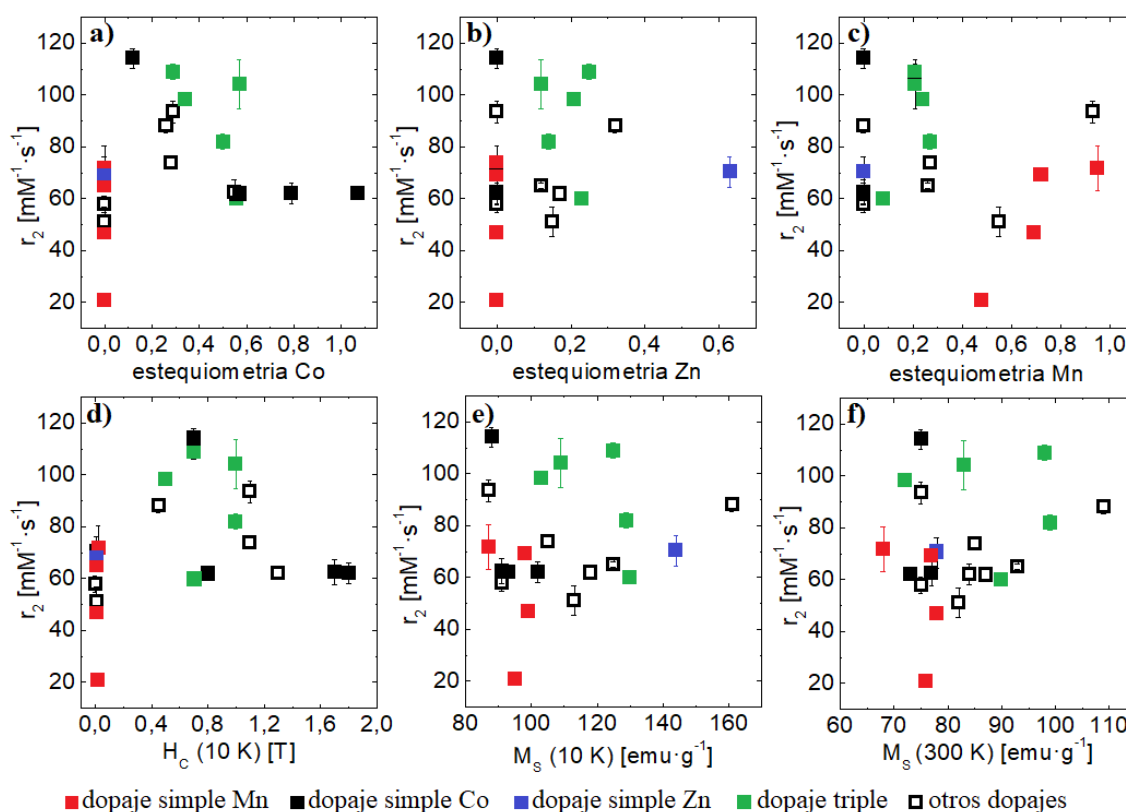


Figura 5.15: Variación de r_2 frente a la estequiometría de los elementos dopantes: a) cobalto, b) zinc y c) manganeso en las MNPs; y frente a d) el campo coercitivo a 10 K, y las magnetizaciones de saturación a e) 10 K y f) 300 K.

Ya que no se ha descartado ningún sistema magnético para el análisis, las distintas representaciones gráficas presentan un gran número de datos experimentales, dificultando en algunos casos su comprensión al alejarse varios de ellos de la tendencia general. A pesar de esto, son varias las conclusiones que pueden extraerse de cómo afectan las características de las MNPs a la relajación transversal de las mismas. Si se

observan las gráficas en las que se representa r_2 frente a la presencia de los tres elementos dopantes ensayados (Figura 5.15a-c) se comprueba que los dopajes moderados parecen promover que los coeficientes de relajación alcancen sus valores máximos. De este modo, se puede observar que cuando las estequiometrías de cobalto y manganeso son superiores a un valor de ca. 0.50 y la de zinc superior a ca. 0.30, los coeficientes medidos presentan un valor más bajo en comparación con los obtenidos a niveles de dopaje inferiores.

Las representaciones gráficas que muestran la dependencia del coeficiente r_2 con los parámetros característicos de los ciclos de histéresis (Figura 5.15d-f) están directamente relacionadas con estas últimos, debido a la correlación existente entre los dopajes y las magnetizaciones de saturación y los campos coercitivos, ya estudiada en este trabajo. Sin embargo, pueden ser útiles para proporcionar otro punto de vista que nos aclare cómo afectan las características magnéticas de las MNPs a su relajación transversal.

Así, se observa que r_2 toma valores reducidos cuando el campo coercitivo de las MNPs es prácticamente nulo o bien cuando presenta valores elevados dentro del rango obtenido, midiéndose los valores máximos de r_2 cuando las coercitividades de las MNPs se encuentran, aproximadamente, en el rango entre 0.4 y 1.1 T. Las gráficas asociadas a las magnetizaciones de saturación presentan un comportamiento menos claro, dado que hay varias muestras con valores de esta magnitud similares pero con valores de r_2 muy distintos, resultando más complicada su interpretación. Sin embargo, si se excluyen del análisis aquellas muestras que presentan cobalto en su estructura, se observa una ligera tendencia creciente de ambas magnitudes, aumentando de forma muy ligera los coeficientes de relajación a medida que se incrementa la magnetización de saturación de las partículas. La presencia de cobalto rompe la tendencia antes descrita incrementando las relajaciones, es decir, aquellas MNPs dopadas con este elemento presentan, por lo general, unos valores de r_2 mayores de los que se esperarían en función de la relación de dependencia entre estos y las saturaciones, especialmente cuando el grado de dopaje es reducido.

De este modo, la presencia de cobalto se muestra como uno de los factores clave para la obtención de elevados coeficientes de relajación transversal. Así, los dopajes con cobalto reducidos, que dan lugar a sistemas con coercitividades en el rango 0.4 T – 1.1

T, son los óptimos para obtener elevados valores de r_2 . Asimismo, se determinó una pequeña relación de aumento simultáneo de las saturaciones y las relajaciones transversales, siendo estos grados reducidos de dopaje con cobalto los únicos que la alteran, dando lugar a que partículas con saturaciones no muy elevadas presenten altos valores de r_2 .

Si se representan en forma de mapa de color los coeficientes r_2 frente a los campos coercitivos y las magnetizaciones de saturación de las ferritas a baja temperatura (Figura 5.16) se corrobora el comportamiento antes descrito, de modo que cuando los campos coercitivos se encuentran en el rango de valores comprendido entre ca. 0.4 y 1.1 T los valores de r_2 son máximos, condición que se cumple dentro de un amplio rango de magnetizaciones de saturación.

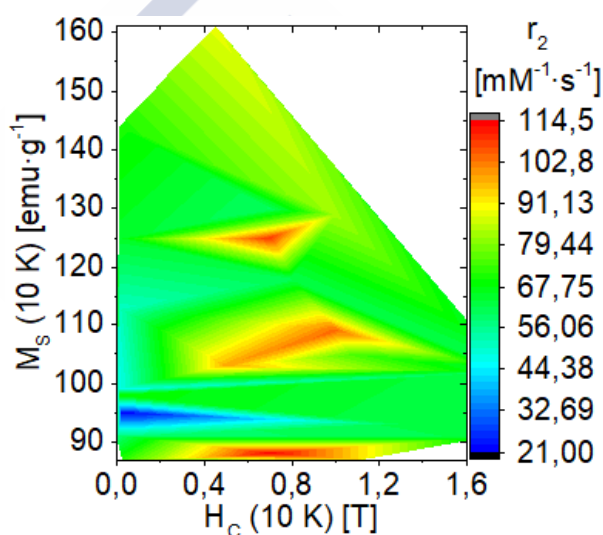


Figura 5.16: Mapa de color de r_2 en función de del campo coercitivo y la magnetización de saturación a 10 K.

Una vez que el análisis de la relajación transversal frente a las características de los ciclos de histéresis permitió establecer una cierta relación entre las diferentes magnitudes, a continuación se pueden asociar estas características magnéticas óptimas a unos determinados grados de dopaje. En este caso, como fue mencionado previamente, el factor clave semeja ser un campo coercitivo cuyo valor, de cara a alcanzar altos valores de r_2 , muestra un intervalo de valores aparentemente óptimo entre ca. 0.4 y 1.1 T. El campo coercitivo, altamente dependiente de la proporción de cobalto, varía en este rango de valores cuando la estequiometría de este elemento en las MNPs como

elemento dopante único es baja, no superior a aproximadamente 0.50, aunque puede ser incrementada ligeramente si se combina con ciertas cantidades de manganeso y/o zinc.

Por su parte, los coeficientes de relajación transversal de las MNPs también presentan un valor más elevado cuanto mayor son sus saturaciones, si bien la presencia de cobalto antes mencionada se muestra como una condición claramente dominante. Los dopajes con zinc en estequiometrías próximas a 0.30 fueron establecidas como la condición necesaria para lograr altos valores de magnetización de saturación, por lo que esta condición también resulta favorable para la obtención de partículas con altos valores de r_2 .

Si se observa la Tabla 3.21, donde se recogen los valores de r_2 medidos en cada sistema de MNPs, se comprueba que las tres muestras que presentan un valor superior a $100 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ son: $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$ ($114.2 \pm 3.7 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ ($109.0 \pm 3.0 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) y $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$ ($104.3 \pm 9.5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Todas estas MNPs cumplen las características de dopaje antes determinadas como óptimas exceptuando, si acaso, una presencia excesiva de cobalto en la tercera, que a pesar de no estar modificada con muy altas cantidades de zinc ni manganeso, presenta un valor de campo coercitivo (0.8 T) dentro del rango óptimo. Incluso las tres siguientes MNPs con mayor valor de r_2 y, por ende, con un mayor potencial como agentes de contraste negativos, también muestran unas composiciones que validan de nuevo los rangos de dopaje establecidos como óptimos: $\text{Zn}_{0.21}\text{Co}_{0.34}\text{Mn}_{0.24}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ ($98.2 \pm 2.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), $\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.93}\text{Fe}_{1.78}\text{O}_4$ ($93.5 \pm 4.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) y $\text{Zn}_{0.32}\text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{2.42}\text{O}_4$ ($88.1 \pm 2.5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).

Al haber medido ambas magnitudes en todos los sistemas, resulta útil establecer un estudio comparativo de los valores de r_2 y SAR obtenidos para las diferentes MNPs esféricas de ca. 8.50 nm de diámetro sintetizadas en el Capítulo 3, a fin de comprobar si aquellas con una mayor capacidad hipotérmica se corresponden con los que ofrecen mejores prestaciones como agentes de contraste negativos (Figura 5.17).

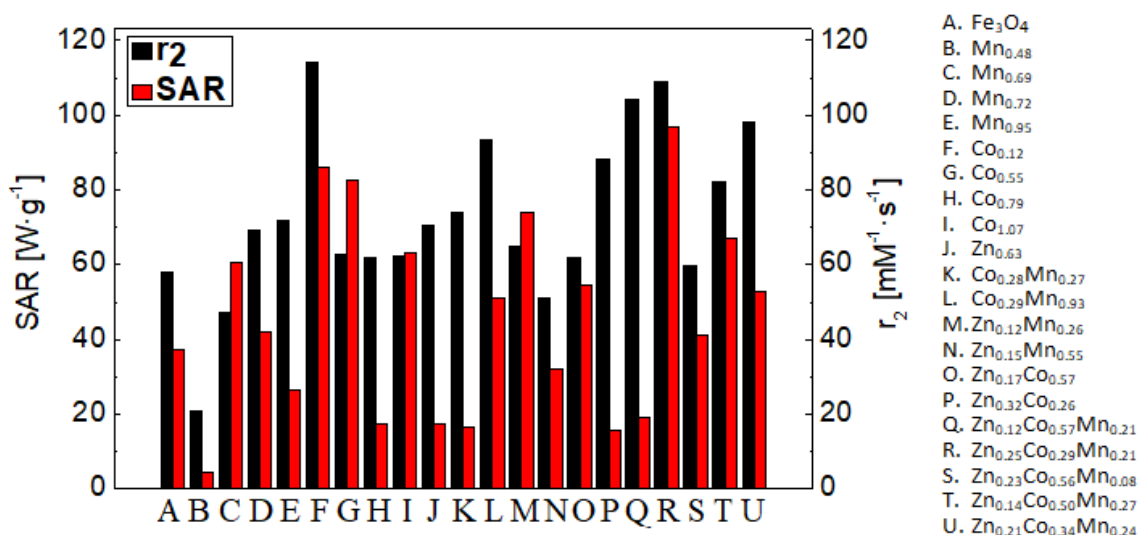


Figura 5.17: Valores de SAR y r_2 medidos en los distintas ferritas esféricas dopadas.

Tal y como era de esperar, se comprueba que son varias las MNPs que presentan un valor de SAR pequeño y uno elevado de r_2 y viceversa. Esto coincide con las deducciones efectuadas sobre los dopajes óptimos para lograr valores elevados de cada una de estas magnitudes, que eran diferentes en cada caso. A ello hay que sumar las pequeñas diferencias de tamaño entre las distintas MNPs, factor que ejercía una importante influencia sobre la capacidad hipotérmica de las MNPs en función de los resultados obtenidos, pero no tan relevante sobre sus relajaciones transversales²¹. Sin embargo, son varias las muestras, especialmente las de composición $\text{Co}_{0.12}\text{Fe}_{2.88}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.12}\text{Co}_{0.57}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.10}\text{O}_4$, las que deparan valores tanto de SAR como de r_2 elevados. Estas características combinadas hacen que estas MNPs sean particularmente interesantes debido a su posible idoneidad en la aplicación tanto como agentes de contraste negativos en MRI como en el campo de la hipertermia magnética.

5.2.1.6. Medidas preliminares de la capacidad hipotérmica y de la relajación transversal de las MNPs con estructura núcleo-coraza

En este apartado, se estudiaron de forma preliminar las características de las MNPs con estructura núcleo-coraza sintetizadas en el Capítulo 3 de cara a su posible aplicación como agentes activos en MRI e hipertermia magnética. Para ello, se determinaron el coeficiente de relajación transversal y el SAR en las MNPs núcleo-

coraza resultantes de la que llamamos síntesis típica, consistentes en un núcleo de 7.50 nm de diámetro de composición $\text{Co}_{0.79}\text{Fe}_{2.21}\text{O}_4$ y con una coraza de 3.53 nm de espesor de composición $\text{Mn}_{0.40}\text{Fe}_{2.60}\text{O}_4$. Los valores de SAR y r_2 obtenidos fueron $174.4 \pm 6.8 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ y $318.8 \pm 9.3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, notablemente superiores a los de las ferritas de forma esférica de ca. 8.50 nm de diámetro y composición homogénea (sin estructura núcleo-coraza) analizadas anteriormente. Tanto el mayor tamaño de estas estructuras, en comparación con las ferritas esféricas, como, fundamentalmente, el grado de anisotropía “ideal” que muestran dan lugar a que presenten unas valores de estas magnitudes más elevados^{38,39}. Quedan pendientes de efectuar para un trabajo futuro las medidas correspondientes a las demás muestras para así estudiar la dependencia de estas magnitudes con el espesor y la composición de los núcleos empleados como semillas y de las corazas crecidas a su alrededor, y determinar cuál de estas MNPs presenta una mayor capacidad de cara a potenciales aplicaciones en el campo de la hipertermia magnética y como agentes de contraste negativos para la obtención de imágenes MRI. Asimismo, una vez obtenidos todos los datos, se podrá establecer si estos importantes aumentos en el SAR y el coeficiente r_2 , que se intuyen en la única muestra analizada, son debidos al grado de anisotropía óptimo que se logra en esta clase de MNPs núcleo-coraza o bien, menos probable, a un simple aumento de tamaño. De ser la última causa, se podrían sintetizar ferritas con las composiciones previamente determinadas como óptimas para potenciar cada una de estas dos magnitudes pero con un tamaño sensiblemente superior, pudiendo así efectuar un análisis del compromiso existente entre el tamaño y la potencia magnética mejorando, incluso, los elevados valores obtenidos.

5.2.2. Ensayos *in vitro*: Cultivos celulares

El análisis de las propiedades magnéticas de las diferentes MNPs sintetizadas, así como el estudio de su capacidad como agentes de hipertermia magnética y como agentes de contraste para la obtención de imágenes mejoradas mediante MRI, mostraron que varias de ellas resultaban interesantes de cara a su posible aplicación médica. Aparte de la estabilidad de las MNPs en diferentes fluidos biológicos, lograda a través de diferentes técnicas de funcionalización y ya explicada en detalle en los Capítulos 2 y 3, es importante comprobar el nivel de toxicidad de las mismas en cultivos celulares *in*

vitro, así como determinar si se produce su incorporación al interior de las entidades biológicas. Asimismo, también resulta de capital interés comprobar si mantienen sus propiedades magnéticas al ser transferidas a los microambientes celulares, estudios todos estos que serán llevados a cabo en este apartado.

5.2.2.1. Análisis de la citotoxicidad celular de las MNPs

La toxicidad de las MNPs de forma cúbica y esférica que mostraron una elevada capacidad como agentes hipertérmicos y/o como agentes de contraste MRI fue evaluada en cultivos celulares *in vitro*. Se estudiaron diferentes MNPs funcionalizadas con el complejo PMA-dodecilamina y, adicionalmente, uno de los sistemas de nanocubos recubiertos con DMSA, a fin de comprobar el hipotético efecto de los diferentes recubrimientos sobre la toxicidad celular de los nanosistemas magnéticos. Así, la citotoxicidad de las MNPs funcionalizadas poliméricamente se estudió en las líneas celulares HeLa (cáncer cérvico-uterino) y RAW 264.7 (macrófagos murinos), mientras que, debido a la indisponibilidad de estas últimas células en el momento en que se llevaron a cabo los ensayos, los experimentos con los nanocubos funcionalizados con DMSA se efectuaron en las líneas celulares HeLa y MDA-MB-231 (cáncer de mama). En todos los casos, las medidas de toxicidad celular se efectuaron tras dos tiempos de incubación diferentes, 6 y 24 h, midiéndose el porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de MNPs transcurridos dichos períodos de tiempo.

En la Figura 5.18 se muestran los datos del porcentaje de viabilidad celular de las MNPs de morfología cúbica con un tamaño de arista de ca. 40 nm y composición $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$ tras 6 y 24 h de incubación en líneas celulares HeLa y RAW 264.7.

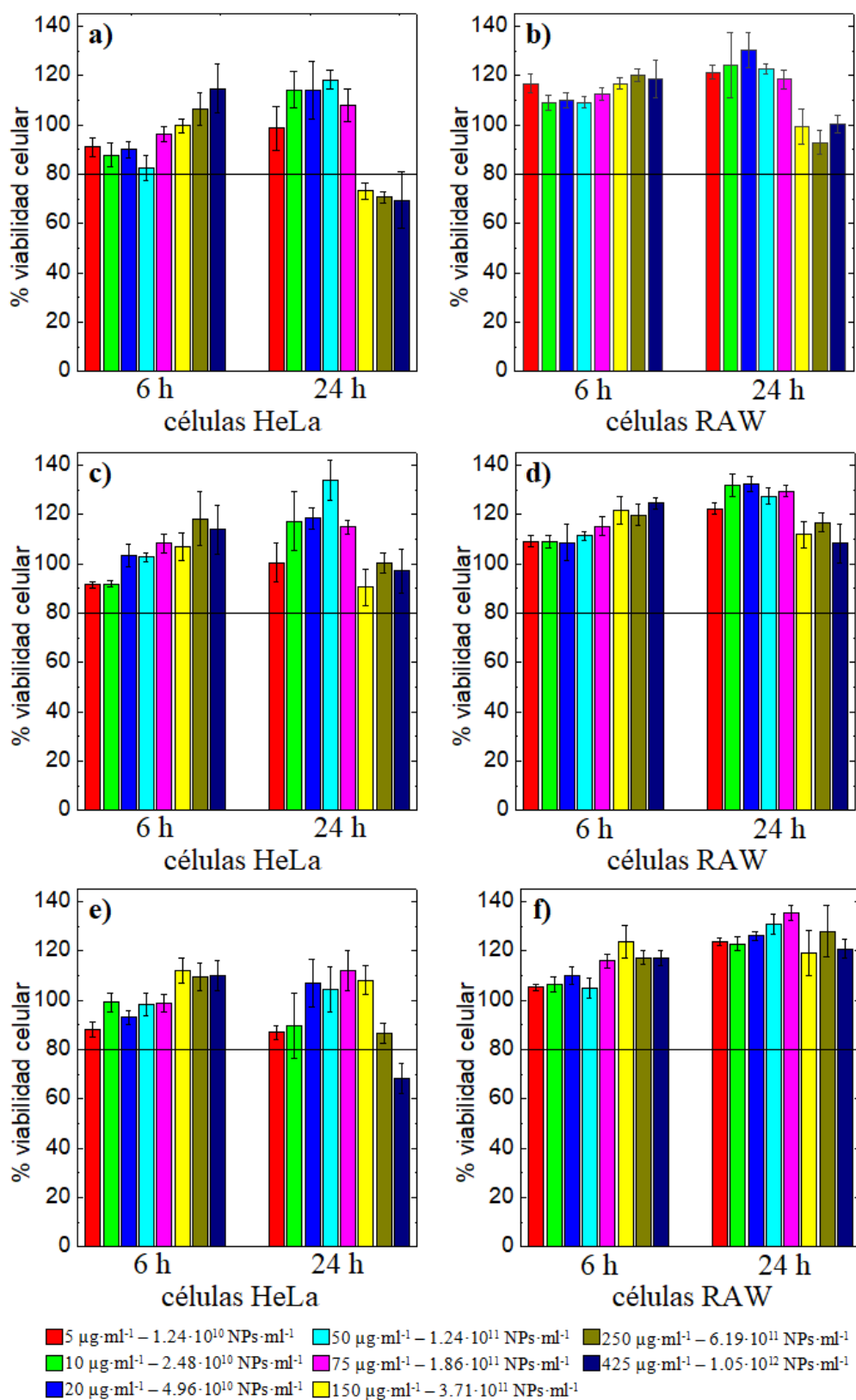


Figura 5.18: Porcentaje de viabilidad celular tras 6 y 24 h de incubación de los nanocubos de composición: $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$ en células a) HeLa y b) RAW 264.7; $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ en células c) HeLa y d) RAW 264.7 y $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$ en células e) HeLa y f) RAW 264.7, respectivamente.

En la Figura anterior se puede comprobar que, como norma general, los tres tipos de MNPs de forma cúbica analizados no resultan tóxicos en las líneas celulares ensayadas. Es importante hacer notar que las concentraciones de MNPs utilizadas, en un rango comprendido entre $1.2 \cdot 10^{10}$ MNPs \cdot ml $^{-1}$ y $1.0 \cdot 10^{12}$ MNPs \cdot ml $^{-1}$, son relativamente altas en comparación con las empleadas en estudios previos^{40,41}, a pesar de lo cual el grado de citotoxicidad de las MNPs es reducido. En los ensayos efectuados con células RAW 264.7 el porcentaje de viabilidad celular medido con las diferentes MNPs y a los distintos tiempos de incubación ensayados no decae en ningún caso por debajo del 80%, valor típicamente establecido como umbral para determinar si un determinado sistema resulta tóxico en una línea celular⁴². En los ensayos efectuados con células HeLa, por su parte, sí se obtuvieron valores inferiores al citado porcentaje umbral del 80 %, determinándose unas concentraciones críticas de citotoxicidad inferiores a las máximas ensayadas tras 24 h de incubación en dos de los sistemas magnéticos estudiados. Así, las MNPs de composición $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$ se muestran como tóxicas en células HeLa tras 24 h de incubación a concentraciones superiores a $1.86 \cdot 10^{11}$ MNPs \cdot ml $^{-1}$, mientras que en las MNPs de composición $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$ esta concentración crítica de toxicidad es de $6.19 \cdot 10^{11}$ MNPs \cdot ml $^{-1}$.

Las concentraciones críticas de citotoxicidad que presentan cada uno de las MNPs en las líneas celulares y a los tiempos de incubación ensayados son, en todos los casos, elevadas. Esto posibilita, de cara a sus posibles aplicaciones clínicas, la administración de una elevada cantidad de MNPs con el consecuente aumento de la potencia magnética que estas pueden generar.

Asimismo, de acuerdo con varios estudios previos^{43,44}, los nanocubos dopados con cobalto son los que presentan la concentración crítica de citotoxicidad más baja, dado que este elemento resulta tóxico si es liberado en un ambiente celular. Al estar presente en bajo porcentaje y constituirse en la estructura cristalina de sistemas nanoparticulados, protegidos estos además por un recubrimiento polimérico, el cobalto no es necesariamente liberado (al menos en muy altas proporciones) en los ensayos en medios celulares, pudiendo abrir la ventana del uso de MNPs compuestas por este elemento en aplicaciones biomédicas, al menos cuando este está presente en bajas proporciones en su composición. Sin embargo, como se ha comentado, su presencia se traduce en una concentración crítica de toxicidad más baja que en sistemas similares sin presencia de este dopante.

A continuación, se analizó la citotoxicidad de dos de los tipos de MNPs esféricas sintetizadas en el Capítulo 3 que mostraron una mayor potencia magnética en las pruebas efectuadas. Nuevamente, el ensayo se realizó utilizando las líneas celulares HeLa y RAW 264.7, y midiendo la citotoxicidad tras 6 y 24 h de incubación. Los dos sistemas magnéticos estudiados fueron los de composición $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ y $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, a unas concentraciones magnéticas ligeramente superiores debido a la masa más pequeña de estas MNPs.

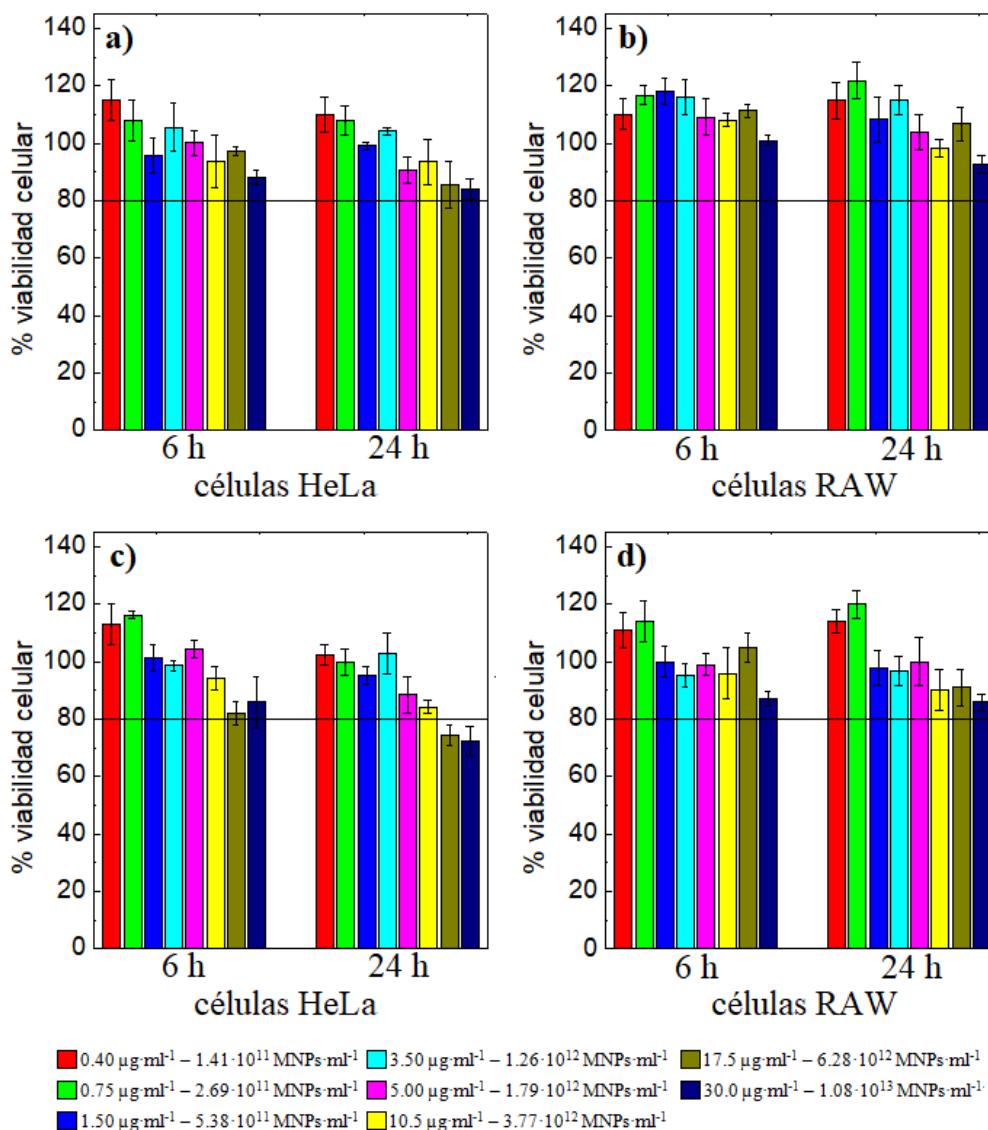


Figura 5.19: Porcentaje de viabilidad celular tras 6 y 24 h de incubación de las MNPs esféricas de composición: $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ en células a) HeLa y b) RAW 264.7; y $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$ en células c) HeLa y d) RAW 264.7.

Se observa que, al igual que sucedía con las MNPs de forma cúbica de 40 nm de longitud de arista, las ferritas de ca. 8.50 nm de diámetro estudiadas no presentan, en general, un comportamiento citotóxico a los tiempos de incubación y en las líneas celulares ensayadas. Las MNPs de composición $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$ no resultan tóxicas para las células bajo ninguna de las condiciones analizadas. Por su parte, las MNPs de composición $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$ sólo presentan comportamiento tóxico en células HeLa tras 24 h de incubación a concentraciones superiores a $6.28 \cdot 10^{12}$ MNPs·ml⁻¹, dando lugar a porcentajes de viabilidad celular superiores al 80% tanto en los ensayos con células HeLa a 6 h como en los ensayos con células RAW 264.7 a los dos tiempos de incubación ensayados.

Por tanto, en las MNPs esféricas nuevamente vuelven a ser los sistemas con una mayor presencia de cobalto los que muestran una concentración umbral de toxicidad más baja, característica también observada previamente en los nanocubos de ca. 40 nm estudiados. A pesar del carácter citotóxico que presenta el cobalto al ser liberado en medio celular⁴³, su confinamiento dentro de la estructura interna de las MNPs permite que estas se puedan utilizar a concentraciones elevadas sin que ello provoque una elevada tasa de mortalidad en las células, al menos en las condiciones del presente estudio.

Es importante destacar que, a pesar de que las concentraciones críticas de citotoxicidad de las MNPs cúbicas son inferiores a las determinadas para MNPs esféricas cuando se expresan en número de MNPs por unidad de volumen, estas pasan a ser marcadamente superiores cuando las concentraciones se escriben en forma de masa por unidad de volumen. Esta diferencia al cambiar la métrica es consecuencia lógica de la mayor masa de los nanocubos debida, a su vez, a su mayor tamaño. De este modo, la masa de material magnético que puede ser añadida a los cultivos celulares sin que esta resulte tóxica es mayor en el caso de los nanocubos de ca. 40 nm que en el de las MNPs esféricas de ca. 8.50 nm, lo cual implica, entre otras cuestiones, la posibilidad de desarrollar una mayor potencia magnética en un tratamiento de hipertermia.

La mayor citotoxicidad de MNPs de tamaño reducido ya fue determinada por autores como Pan *et al.*⁴⁵, que observaron que la citotoxicidad de NPs esféricas de oro disminuía con su diámetro en el rango comprendido entre 1.4 nm y 15 nm en diferentes líneas celulares. Este fenómeno fue asociado a las diferentes formas de interacción de

las NPs con las membranas celulares en función de sus tamaños, dando lugar a distintos mecanismos de muerte celular.

Asimismo, como fue comentado previamente, también se efectuaron ensayos de citotoxicidad celular con los nanocubos de magnetita de ca. 40 nm de longitud de arista funcionalizados con DMSA. En el momento de la realización de estos ensayos no se disponía de la línea celular RAW 264.7, por lo que con fin de disponer de resultados en dos líneas celulares diferentes se implementaron los ensayos también en la línea celular MDA-MB-231 (Figura 5.20)

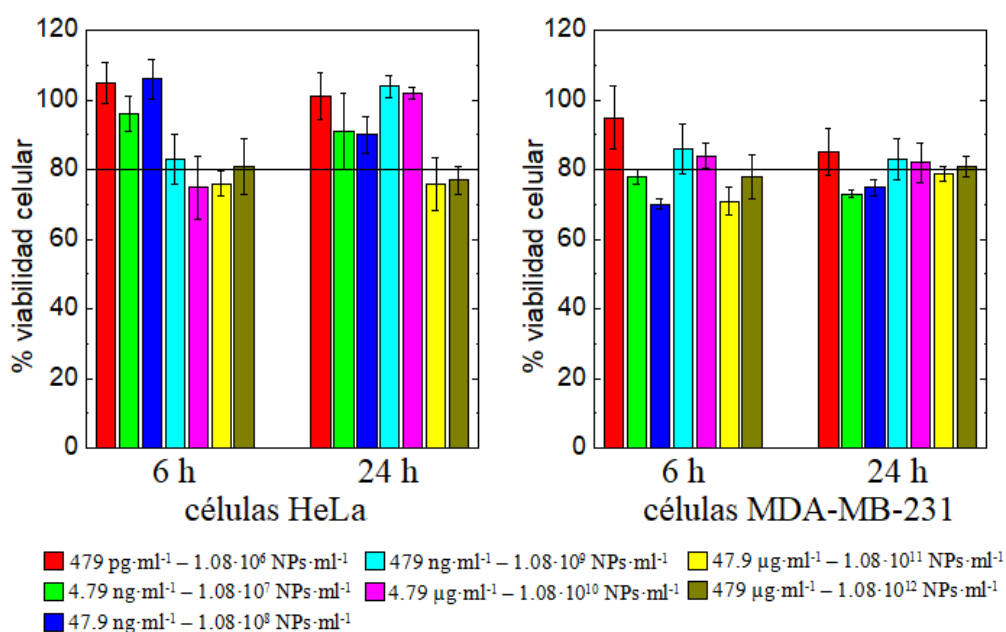


Figura 5.20: Porcentaje de viabilidad celular tras 6 y 24 h de incubación de los nanocubos de magnetita recubiertos con DMSA en células a) HeLa y b) MDA-MB-231.

Los ensayos de citotoxicidad de los nanocubos funcionalizados con DMSA confirman la menor idoneidad de este recubrimiento. Las MNPs implementadas en el experimento anterior muestran unos porcentajes de viabilidad celular inferiores a los de las recubiertas con el complejo PMA-dodecilamina, a pesar de ensayar concentraciones inferiores. De este modo, se confirma que la menor estabilidad y la mayor tendencia a la agregación que inducen los recubrimientos con DMSA, previamente estudiado, también se traducen en una mayor toxicidad de las MNPs en las líneas celulares ensayadas. Nótese que en estas, tanto tras 6 h como 24 h de incubación, se midieron porcentajes de viabilidad celular inferiores al 80%, representativo de un carácter tóxico del sistema

empleado. Asimismo, se comprueba que no en todos los casos los valores de concentración de MNPs determinados como tóxicos se corresponden con los más altos inyectados, consecuencia probablemente del carácter no completamente homogéneo de las disoluciones acuosas de MNPs debido a la tendencia de estas a constituirse en forma de pequeños agregados.

Por último, cabe mencionar que los porcentajes de viabilidad celular superiores al 100% medidos en los diferentes ensayos de citotoxicidad efectuados con anterioridad, especialmente en aquellos llevados a cabo con células RAW 264.7, se atribuyen a la elevada actividad proliferativa de las células al detectar estas la presencia de cuerpos extraños como las MNPs. Mediante este mecanismo, las entidades celulares incrementan el grado de internalización de las nanoestructuras magnéticas y se mejora el grado de eficiencia en su eliminación.

5.2.2.2. Análisis de la internalización celular de las MNPs

Se llevó a cabo un análisis del proceso de internalización de las MNPs de morfología cúbica dentro de la estructura de las células mediante microscopía óptica. Siguiendo el protocolo expuesto en el apartado de Materiales y Métodos, en algunas pruebas se empleó el reactivo prussian blue como tinte para dotar de un mayor contraste a las MNPs. A modo de ejemplo, se estudió la internalización de los nanocubos con un tamaño de arista de ca. 40 nm y composición $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$ en células HeLa tras unos períodos de incubación de 6 y 24 h (Figura 5.21). La concentración de MNPs suministrada fue de $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, valor muy próximo al previamente establecido como umbral de citotoxicidad (a 24 h) de este tipo de nanoestructuras magnéticas para esta línea celular.

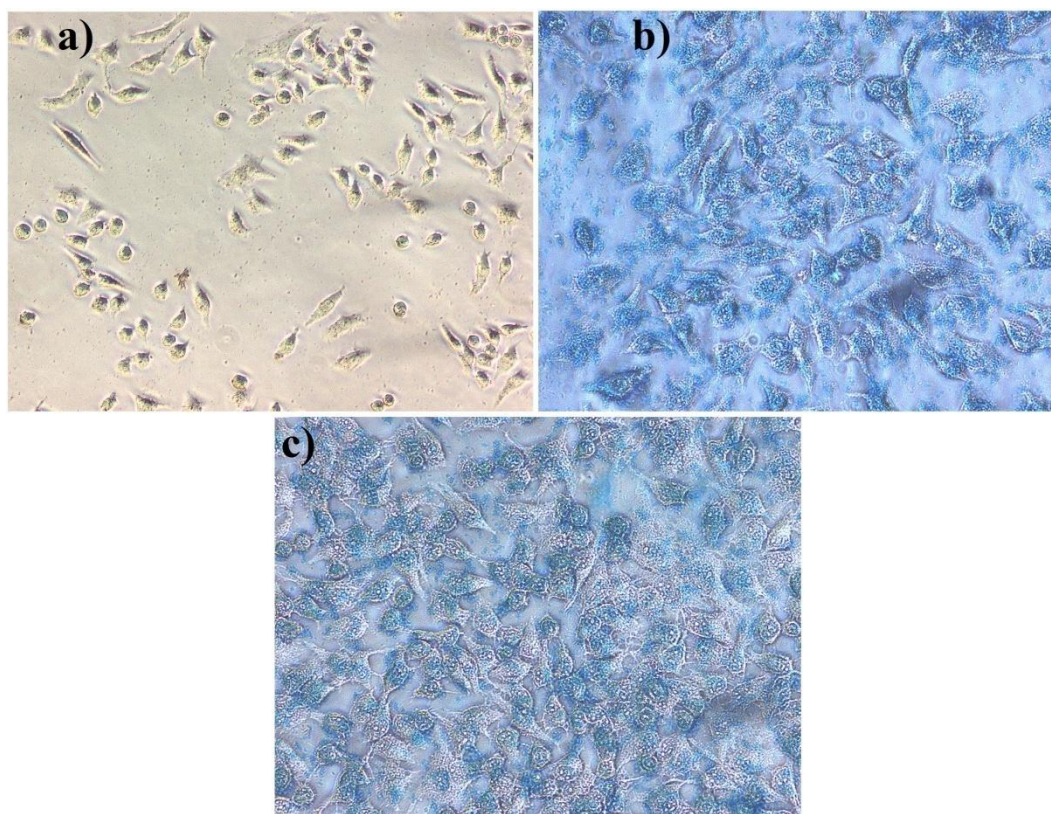


Figura 5.21: Imágenes de microscopía óptica de los nanocubos de composición $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$ en células HeLa tras a) 6 h (10X), b) 6 h (20X, tinción con prussian blue), y c) 24 h (20X, tinción con prussian blue) de incubación.

En las imágenes anteriores se observa que el grado de internalización de las MNPs es elevado, encontrándose una gran mayoría de ellas dentro de las estructuras celulares. En la imagen correspondiente a la muestra de células con MNPs sin el tratamiento con prussian blue tras 6 h de incubación (Figura 5.21a) las células presentan un contraste oscuro, asociado con total probabilidad a la abundante presencia de los nanocubos en su interior. En el exterior de las entidades celulares, en cambio, estas zonas de contraste oscuro son mínimas, demostrándose así el alto grado de incorporación celular del sistema magnético antes comentado.

La muestras que fueron tratadas con prussian blue (Figura 5.21b-c), por su parte, corroboran las observaciones antes efectuadas, si bien el elevado grado de tinción, debido posiblemente al uso de una excesiva cantidad del citado reactivo, hace que las imágenes no sean tan claras como se desearía. A pesar del color azulado que muestra todo el sistema, tanto las células como el fondo correspondiente al cristal de cultivo no

recubierto, se observa que dicho color azul es mucho más intenso en el interior de las entidades celulares, lo cual da de nuevo pie a pensar en un alto grado de internalización del sistema. Recordemos que el tinte empleado se caracteriza por asociarse con el hierro dotando al mismo de un tono azulado, por lo que aquellas zonas de la imagen dónde este sea más intenso se asocian a la presencia de una mayor cantidad de MNPs. Asimismo, son también destacables las escasas diferencias entre las muestras correspondientes a períodos de incubación de 6 y 24 h, lo cual permite concluir que el grado de internalización de los nanocubos es ya importante tras las primeras 6 h.

Cabe mencionar que al ver los cristales de cultivo directamente en el microscopio se observa que el grado de agregación de los nanocubos estudiados tras el proceso de internalización celular es bastante reducido, a pesar de que en las anteriores imágenes obtenidas esto no se percibe con claridad. Así, las MNPs se distinguían en muchos casos como diferencias de contraste de muy pequeñas dimensiones y, dado el número de aumentos al que se realizaban las observaciones, estas se corresponden con entidades en la escala nanométrica, lo cual implica un grado de agregación reducido.

En cuando a las características de las células HeLa tras producirse la internalización del sistema magnético implementado, se observa en las imágenes de microscopía óptica que varias de ellas pierden su morfología alargada característica y adquieren una forma más esférica, lo cual es sintomático muerte celular o, al menos, han entrado en un presumible estado apoptótico⁴⁶. Sin embargo, los ensayos de citotoxicidad previamente efectuados demostraron que la concentración de MNPs implementada no resultaba tóxica para esta línea celular, midiéndose porcentajes de viabilidad superiores al 80%. De este modo, resulta probable que la causa de estas alteraciones no se encuentre, al menos totalmente, en el proceso de internalización de las MNPs, sino en los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas de cara a la preparación de las muestras para su observación en el microscopio. Parte de estos procedimientos, tales como las diferentes etapas de lavado o las tinciones, no se efectuaron bajo las condiciones de temperatura, humedad, etc... a las que las células deben ser preservadas, pudiendo esto acarrear la muerte o alteración de algunas de ellas.

Por otra parte, también se analizó el grado de internalización celular de los nanocubos de óxido de hierro sin dopar funcionalizados con DMSA (Figura 5.22). El estudio se efectuó nuevamente en células HeLa tras un período de incubación de 24 h.

En este caso, la concentración de nanocubos ensayada fue de $0.479 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ que, procediendo de igual forma que en el experimento previo con los nanocubos funcionalizados poliméricamente, supone un valor próximo al establecido como crítico en los ensayos de citotoxicidad. En esta ocasión, la internalización celular de las MNPs se evaluó mediante microscopía confocal, usando DAPI para teñir los núcleos celulares (en azul) y bodipi-faloidina para teñir los citoplasmas (en rojo).

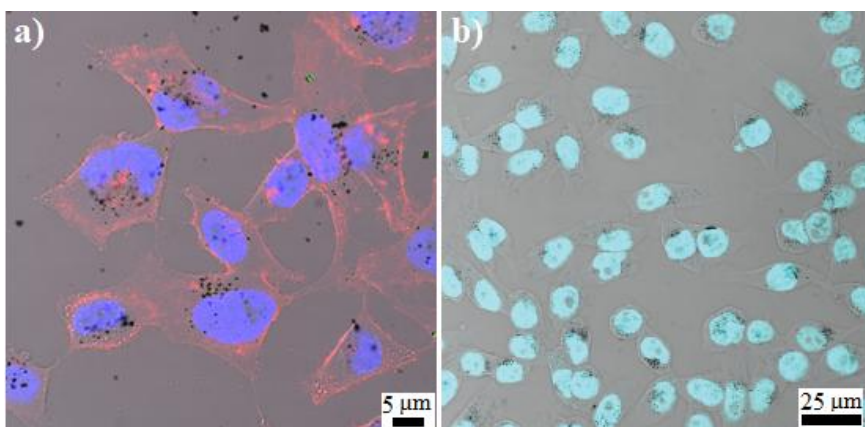


Figura 5.22: Imágenes de microscopía confocal de células HeLa con nanocubos modificados con DMSA tras 24 h de incubación a) con los núcleos teñidos con DAPI (en azul) y los citoplasmas teñidos con bodipi-faloidina (en rojo); y b) solo con los núcleos teñidos con DAPI.

Las imágenes de microscopía muestran que los nanocubos funcionalizados con DMSA presentan un elevado grado de internalización en células HeLa transcurridas 24 h de incubación, si bien este semeja menor que el observado previamente en las MNPs recubiertas poliméricamente. Un alto porcentaje de las MNPs se localizan en los citoplasmas de las células, mostrando muchas de ellas una distribución perinuclear que ya ha sido descrita para otros sistemas nanoparticulados al ser internalizados en líneas celulares⁴⁷. Por otra parte, el análisis en tres dimensiones que puede ser efectuado mediante microscopía confocal muestra que la pequeña cantidad de nanocubos que semejan encontrarse en el interior de los núcleos celulares se encuentran en realidad sobre los mismos, habiendo sido correctamente internalizados en los citoplasmas pero no penetrando en los núcleos.

Cabe destacar también que, tal y como se podía esperar en vista de los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad efectuados a estos nanocubos funcionalizados con DMSA, las MNPs muestran un cierto grado de agregación en las imágenes de

microscopía confocal. Sin embargo, a pesar de observarse que los nanocubos modificados con DMSA se constituyen en forma de pequeños agregados tras efectuar el recubrimiento, debido a que este no previene de forma eficiente la interacción electrostática entre las MNPs, estas se internalizan en un alto porcentaje en las células HeLa.

5.2.2.3. Análisis de las propiedades magnéticas de las MNPs internalizadas en las células

Tras haber establecido los umbrales mínimos de citotoxicidad en diferentes líneas celulares y haber evaluado de forma cualitativa el grado de internalización (en este caso en células HeLa) de los nanocubos de ca. 40 nm con los diferentes recubrimientos ensayados, a continuación se analizó el grado de conservación de las propiedades magnéticas de las diferentes MNPs una vez estas se encontraban en el interior de las entidades celulares. En este ensayo, una vez constatado mediante diferentes pruebas la mayor agregación entre las MNPs inducida por los recubrimientos con DMSA, se limitó el estudio a los sistemas de nanocubos funcionalizados poliméricamente. De igual forma que se procedió para los estudios de citotoxicidad, se escogieron aquellos sistemas que mostraron una mayor potencia magnética en disolución acuosa ($\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$, $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ y $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$). Las diferentes MNPs ensayadas, a una concentración de $425 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (máxima concentración biocompatible), fueron incubadas con células HeLa durante 6 h para lograr su correcta internalización y, posteriormente, siguiendo el protocolo expuesto en la sección de Materiales y Métodos, fueron fijadas en una disolución de glutaraldehído en agua al 2.5% (v/v) para que de este modo las células no se rompiesen liberando las MNPs que se encontraban en su interior⁴⁸. Estas disoluciones de las células fijadas conteniendo MNPs fueron empleadas para medir las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado y para obtener los valores de SAR. Para la correcta normalización de estos resultados la concentración metálica de las disoluciones fue determinada mediante ICP-MS.

Se obtuvieron, en primer lugar, las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado a una temperatura de 300 K de los tres tipos de nanocubos de ca. 40 nm internalizados en células HeLa. En la Figura 5.23 se muestran los ciclos de histéresis medidos en este estudio conjuntamente con los previamente obtenidos de las

mismas MNPs en ausencia de las células bajo la aplicación de un campo magnético máximo de 1 T, valor que en capítulos previos ya se demostró como suficiente para establecer de forma precisa el valor de las magnetizaciones de saturación. La Tabla 5.8 muestra los valores de los parámetros magnéticos característicos para cada tipo de NP y condición experimental.

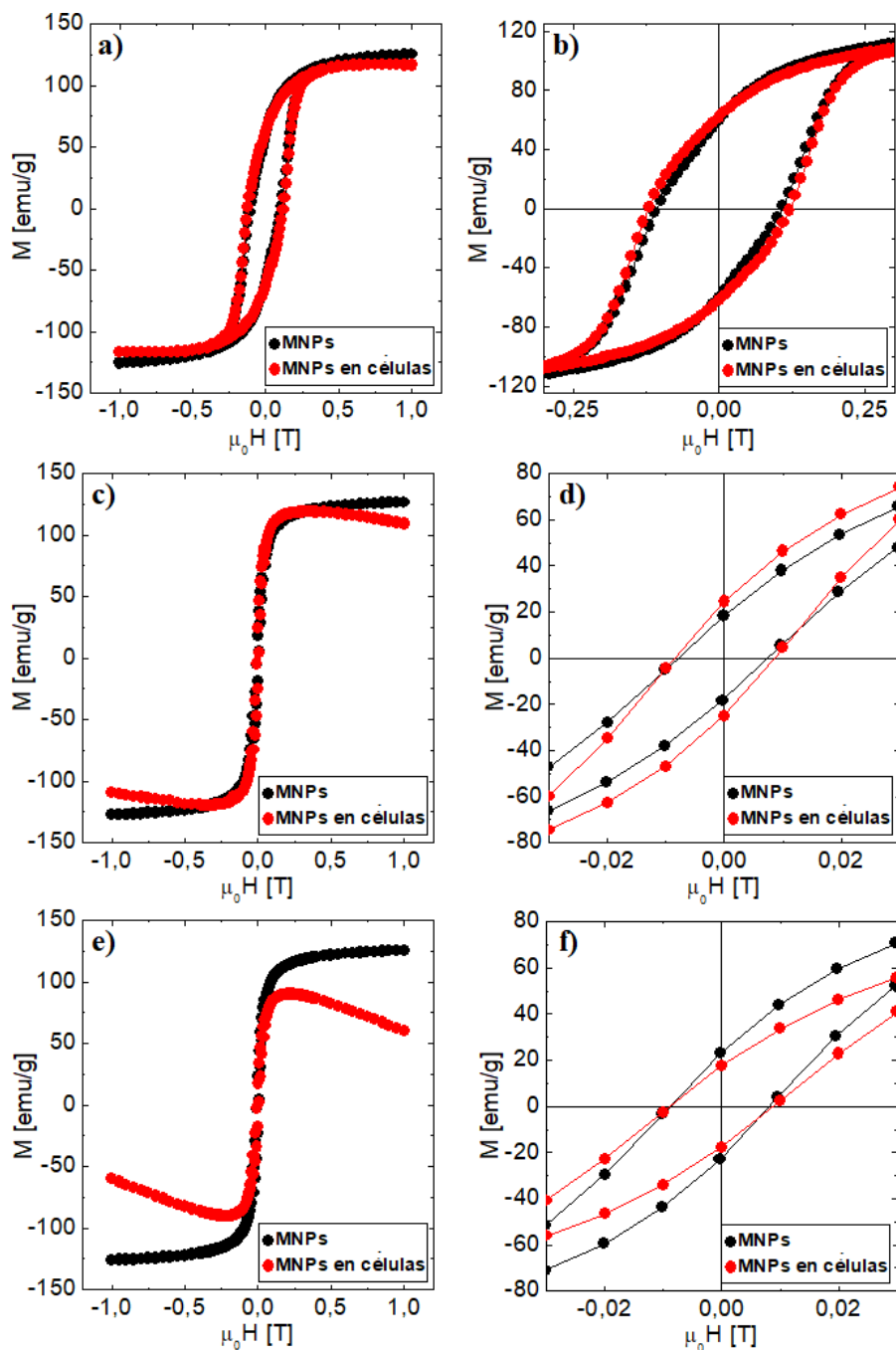


Figura 5.23: Curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado a 300 K de los nanocubos de ca. 40 nm en agua, en el interior de células HeLa, e imágenes ampliadas a campos magnéticos de baja intensidad: a), b) $\text{Co}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4$; c), d) $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ y e), f) $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$.

Tabla 5.8: Valores de campo coercitivo y magnetizaciones de saturación y remanente de los nanocubos de ca. 40 nm estudiados antes y después de su internalización en células HeLa.

Composición	H_c [Oe]		M_s [emu/g]		M_R [emu/g]	
	normal	en células	normal	en células	normal	en células
$Co_{0.17}Fe_{2.83}O_4$	1069.3	1191.1	130.2	122.1	59.8	61.5
$Zn_{0.21}Fe_{2.79}O_4$	76.8	82.8	131.8	129.7	18.0	23.6
$Zn_{0.43}Fe_{2.57}O_4$	84.9	86.0	130.8	106.2	22.5	18.1

Así, se observan pequeñas diferencias de comportamiento entre los tres sistemas de MNPs estudiados tras ser internalizados en células HeLa. En los nanocubos de composición $Zn_{0.43}Fe_{2.57}O_4$ las variaciones en el campo coercitivo y la magnetización remanente al producirse la internalización son menores, detectándose una caída considerable en la magnetización de saturación del sistema, que pasa de 130.8 a 106.2 emu/g. Las MNPs de composición $Zn_{0.21}Fe_{2.79}O_4$, por su parte, apenas ven variadas sus propiedades magnéticas al pasar al citoplasma celular, manteniéndose prácticamente constantes los valores de las magnitudes características de su ciclo de histéresis a 300 K. Por último, los nanocubos dopados con cobalto de composición $Co_{0.17}Fe_{2.83}O_4$ tampoco muestran unas importantes variaciones en sus propiedades magnéticas con respecto a las determinadas antes de su internalización celular, produciéndose pequeños incrementos en su coercitividad y en su remanencia y una ligera caída en su saturación. Cabe recordar que los valores de campo coercitivo y de las magnetizaciones de saturación y remanente de este último sistema, obtenidos en el Capítulo 2, fueron considerados como potencialmente anómalos debido a su elevado valor, dejando abierta la posibilidad de que fuesen debidos a un importante fenómeno de agregación de las MNPs tras ser secadas para su caracterización en el magnetómetro. Los valores de las magnitudes magnéticas obtenidos tras internalizar estas NPs en las células, sin embargo, confirma que eran valores de las magnitudes características del sistema correctos, mostrando el mismo comportamiento dentro de las células que las otras MNPs estudiadas. Así, en estos nanocubos dopados con cobalto también se producen, como ya fue comentado, un ligero incremento en el campo coercitivo y una pequeña caída en la magnetización de saturación.

Mencionar, por último que al igual que sucedía en algunos de los ciclos de histéresis magnética medidos en Capítulos previos, la pendiente negativa que se observa en las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado en las muestras de MNPs internalizadas en células HeLa a valores elevados de esta última magnitud se atribuye a la pequeña cantidad de material magnético empleada para las medidas, lo cual provoca que la contribución diamagnética del portamuestras en el que se insertan los sistemas magnéticos en el magnetómetro cobre cierta relevancia⁴⁹.

A pesar de que los ciclos de histéresis responden a las características intrínsecas de las MNPs, la existencia de pequeñas variaciones al pasar estas al interior celular son esperables. Así, los resultados obtenidos guardan cierta consistencia con estudios previos como, por ejemplo, el llevado a cabo por Di Corato *et al.*⁵⁰. Estos autores sintetizaron varios sistemas nanoparticulados de diferentes características en cuanto a tamaño, morfología y comportamiento magnético, comprobando que los sistemas de dimensiones muy reducidas, con comportamiento superparamagnético, apenas sufrían variaciones en sus curvas de magnetización frente al campo magnético aplicado al ser internalizados en células. Sin embargo, en aquellos sistemas con tamaños próximos o superiores al de la transición al régimen ferromagnético sí se observaban descensos en las saturaciones y pequeños incrementos en la anchura de los ciclos de histéresis tras la internalización celular. Estas últimas variaciones las asociaban, por una parte, a la mayor viscosidad de los fluidos del interior celular y, fundamentalmente, a los fenómenos de agregación entre las MNPs que tenían lugar al penetrar estas en el interior de las células. De este modo, las altas viscosidades provocan que resulte más difícil la “penetración” del campo magnético y la consecuente inducción de un cierto grado de magnetización en los sistemas de elevado tamaño, y que también sea necesario un mayor esfuerzo para desmagnetizarlos, lo cual se traduce en una reducida disminución de las saturaciones y en un aumento de las coercitividades. La agregación de las MNPs, por su parte, da lugar a entidades magnéticas de mayor tamaño, lo cual provoca un aumento aún mayor de los campos coercitivos y compensa, al menos en parte, la disminución de las magnetizaciones de saturación antes explicada^{51,52}.

En los tres sistemas de nanocubos estudiados en el presente trabajo, a pesar de que estos presentan un tamaño superior al de los sistemas de mayores dimensiones analizados por estos autores, se observan tendencias de comportamiento parecidas: descenso en las saturaciones y aumento en las coercitividades de las MNPs al

internalizarse estas dentro de entidades celulares. Que tanto los aumentos en las coercitividades como, en menor medida, las caídas en las saturaciones no sean elevados es, como se explicó previamente, consistente con que los sistemas hayan sufrido niveles de agregación bajos, lo cual confirma la alta eficacia del proceso de recubrimiento polimérico de las MNPs de cara a prevenir su agregación al ser dispersadas en medios biológicos. En este sentido, sólo el sistema de nanocubos de composición $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ presenta un valor de su magnetización de saturación tras su internalización en células HeLa prácticamente idéntico al determinado previamente, lo cual puede ser atribuido a que estos nanocubos sí hayan formado algún pequeño agregado al ser incluidos en el citoplasma celular, si bien el aumento muy bajo del campo coercitivo no respalda esta posibilidad.

Nótese que, dada la baja cantidad total de material magnético utilizada en los ensayos celulares, las medidas de ICP-MS a partir de las cuales se normalizaron las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado dieron lugar a concentraciones metálicas muy bajas. Debido a esto, pequeñas variaciones en estas medidas pueden acarrear importantes incertidumbres en las normalizaciones, lo cual afecta a las magnetizaciones de saturación pero no a los campos coercitivos, pudiendo hallarse en este hecho la causa de la contradicción anterior, concluyendo que los nanocubos con estequiometría $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ tampoco sufrieron problemas importantes de agregación tras su internalización en células HeLa.

Por otra parte, de igual forma que se procedió con los ciclos de histéresis magnética, también se midió la capacidad hipotérmica de los tres sistemas de nanocubos de ca. 40 nm previamente seleccionados mediante la determinación de sus SAR en el interior celular. Nuevamente, las diferentes MNPs ensayadas fueron incubadas con células HeLa durante 6 h y, una vez internalizadas, se fijaron con una disolución de glutaraldehído en agua al 2.5% (v/v) para evitar la ruptura de las membranas celulares y la liberación de las MNPs que se encontraban en su interior⁴⁸. A estas disoluciones de las células con MNPs en glutaraldehído se les aplicó un campo magnético alterno de las características indicadas en la sección de Materiales y Métodos, usando la curva de calentamiento resultante para obtener los valores de SAR¹⁴. En consonancia con todos los resultados previos, los valores obtenidos se normalizaron en base a la concentración metálica de las disoluciones, que fue determinada mediante ICP-MS.

Es importante destacar que, como se mencionó anteriormente, a pesar de haber trabajado con una cantidad importante de células en cada ensayo (alrededor de $3 \cdot 10^6$) y de emplearse la concentración más alta de nanocubos establecida como no tóxica, la masa total de material magnético utilizada en cada experimento es muy reducida. Esto da lugar a que los incrementos de temperatura que se observan al aplicar el campo magnético alterno a los sistemas de MNPs internalizados en las células sean pequeños. Esto, sin embargo, no significa que los valores de SAR sean reducidos, ya que para el cálculo de dicha magnitud las concentraciones de material magnético empleadas, en este caso muy bajas, actúan como divisores.

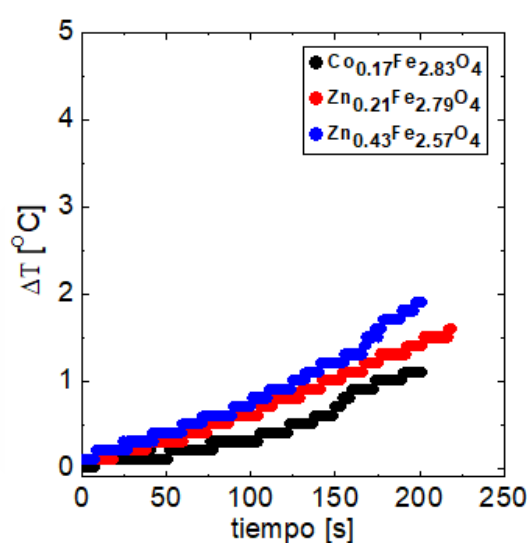


Figura 5.24: Curvas de calentamiento de los distintos nanocubos de ca. 40 nm estudiados tras su internalización en células HeLa bajo la aplicación de un campo magnético alterno.

Tabla 5.9: Valores de SAR de los nanocubos de ca. 40 nm estudiados antes y después de su internalización en células HeLa.

Composición ICP-MS	en células				normal	
	C_{metal} [g·l ⁻¹]	dT/dt [K·s ⁻¹]	SAR [W·g _{met} ⁻¹]	SAR/(H ² ·f) [pJ·m ² ·g ⁻¹ ·A ⁻²]	SAR [W·g _{met} ⁻¹]	SAR/(H ² ·f) [pJ·m ² ·g ⁻¹ ·A ⁻²]
Co _{0.17} Fe _{2.83} O ₄	0.026	0.002	386.4 ± 9.6	2.493 ± 0.062	884 ± 13	5.703 ± 0.084
Zn _{0.21} Fe _{2.79} O ₄	0.044	0.005	514.9 ± 9.8	3.322 ± 0.063	1414 ± 14	9.122 ± 0.090
Zn _{0.43} Fe _{2.57} O ₄	0.046	0.006	513.0 ± 8.8	3.310 ± 0.057	1237 ± 14	7.981 ± 0.090

Así, se observa que la capacidad hipotérmica de los nanocubos estudiados decae de forma considerable tras su internalización en células HeLa, mostrando unos valores de SAR que disminuyen hasta un 35%-45% respecto a los previamente determinados en las disoluciones acuosas de estas mismas MNPs. Así, los nanocubos de composición $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$ pasan de mostrar un valor de SAR de $1414 \pm 14 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ a uno de $514.9 \pm 7.8 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ tras el proceso de internalización celular, lo cual supone una caída del 63.5%, mientras que en el sistema con composición $\text{Zn}_{0.43}\text{Fe}_{2.57}\text{O}_4$ esta caída es ligeramente menor, de aproximadamente un 58.5%. En los nanocubos dopados con cobalto, por su parte, el valor de SAR pasa de $884 \pm 13 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ a $386.4 \pm 9.6 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$, lo que representa un descenso porcentual del 56.3%.

A pesar de que los descensos en los valores de SAR pueden parecer *a priori* excesivos, estos también guardan una elevada consistencia con el trabajo de Di Corato *et al.*⁵⁰, quienes observaron que los valores de SAR de los sistemas magnéticos, al igual que sucedía con sus ciclos de histéresis, sufrían variaciones más importantes cuanto mayor era el tamaño de las MNPs constituyentes. De este modo, en las de tamaño muy reducido, con comportamiento superparamagnético, el valor de SAR medido tras la internalización era aproximadamente un 50% del medido antes del que esta se produjera, mientras que en MNPs de dimensiones próximas al tamaño de transición a régimen ferromagnético este descenso era de hasta un 90%. Estos descensos se atribuyen, por una parte, a la variación en las curvas de magnetización de las MNPs antes explicadas y, por otra, nuevamente a la mayor viscosidad de los fluidos intracelulares⁵³, la cual limita el movimiento de las MNPs haciendo menor la contribución browniana a la generación de calor por parte de las partículas. Así pues, resulta consecuente que las MNPs de mayor tamaño sean las que ven más afectado su valor de SAR al ser internalizadas en entidades celulares dado que son las que tienen una mayor contribución browniana a su capacidad hipotérmica⁵⁴, y aquellas cuyo ciclo de histéresis se ve más afectado por la internalización celular.

En nuestros nanocubos de ca. 40 nm, a pesar de que el tamaño de las MNPs está por encima del valor crítico de transición a régimen ferrimagnético⁵⁵, el descenso que sufren los valores de SAR, entre el 55% y el 65%, es notablemente inferior al esperable. Este hecho puede justificarse, al igual que se hizo previamente con los ciclos de histéresis, en función del bajo grado de agregación de los nanocubos en el interior de las células, lo cual provoca que los ciclos de histéresis y las contribuciones brownianas a

las capacidades hipotérmicas no se vean muy afectadas. Nótese que el movimiento físico de las MNPs da lugar a una contribución a la generación de calor por parte de las mismas que es mayor cuanto más grande es su tamaño. Sin embargo, si el tamaño de las entidades magnéticas continúa aumentando pueden alcanzarse unas dimensiones tales que el campo magnético aplicado no consiga generar ningún tipo de movimiento en las MNPs, de forma que la contribución de este fenómeno al SAR sea nula. De esta forma, las caídas en los valores de SAR al internalizarse en las células HeLa los tres tipos de nanocubos estudiados parecen, de nuevo, corroborar, su escasa agregación, debiéndose dichas caídas únicamente a la mayor viscosidad de los fluidos intercelulares que limitan la movilidad de las MNPs y provocan que la magnetización inducida en estas mediante la aplicación de un campo magnético también se vea ligeramente reducida.

Cabe mencionar que se efectuaron diferentes pruebas preliminares de cara a determinar los ciclos de histéresis y los valores de SAR de algunas de las ferritas de ca. 8.50 nm de diámetro sintetizadas en el Capítulo 3 tras su internalización en células HeLa. Sin embargo, en este caso, el problema antes mencionado de la pequeña cantidad de material magnético detectada mediante ICP-MS se hace especialmente evidente, con valores en algunos casos inferiores incluso a los propios márgenes de incertidumbre. Recordemos que estas medidas de ICP-MS son imprescindibles de cara a la correcta normalización de los valores de SAR y de magnetización. De esta forma, se muestra como necesario llevar a cabo ensayos de internalización con cantidades muy elevadas de células para que, de este modo, la cantidad de MNPs añadidas, siempre por debajo del umbral de citotoxicidad, sea lo suficientemente elevada para generar una buena señal de ICP-MS.

A pesar de estos ensayos fallidos para determinar la capacidad hipotérmica en células de las MNPs superparamagnéticas previamente sintetizadas, se pueden comparar los valores de SAR de los nanocubos de ca. 40 nm estudiados tras su internalización con los de las ferritas de ca. 8.50 nm en disolución acuosa. En base a los trabajos previos efectuados⁵⁰ se puede concluir que el SAR de estos últimos sistemas al ser internalizados en células puede permanecer invariante o disminuir, pero en ningún caso va a aumentar, de modo que tenemos un umbral superior en base al que establecer la comparación.

De este modo, el valor máximo de SAR medido en los nanocubos de ca. 40 nm tras su internalización en células HeLa fue de aproximadamente $514.9 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$, correspondiente al sistema de composición $\text{Zn}_{0.21}\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$. Por su parte, en el caso de las MNPs superparamagnéticas en disolución acuosa este valor máximo fue de $96.8 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$, medido en este caso en un sistema de composición $\text{Zn}_{0.25}\text{Co}_{0.29}\text{Mn}_{0.21}\text{Fe}_{2.25}\text{O}_4$. Nótese sin embargo que, tal y como se mencionó en repetidas ocasiones en capítulos previos, las características del campo magnético alterno aplicado bajo el que se midieron las capacidades hipotérmicas de los sistemas fueron diferentes para cada tipo de MNPs. Así pues, para efectuar la comparación entre ambos procede recurrir a la normalización de los valores de SAR obtenidos, dividiéndolos entre el producto del cuadrado de la amplitud del campo magnético por la frecuencia del mismo. Este cociente es el más empleado en estudios recientes para poder comparar las capacidades hipotérmicas de sistemas magnéticos medidas bajo campos aplicados de diferentes características. Efectuando dicha normalización, las máximas capacidades hipotérmicas de los nanocubos de ca. 40 nm en células y de las nanoesferas de ca. 8.50 nm en disolución acuosa son de 3.32 y $0.39 \text{ pJ}\cdot\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{A}^{-2}$, respectivamente.

De esta forma se comprueba que, incluso en el supuesto de que las MNPs de forma esférica conservasen toda su potencia magnética tras ser internalizadas en células HeLa, la capacidad como agentes de hipertermia magnética de los nanocubos de ca. 40 nm es notablemente superior, existiendo aproximadamente un factor 8.5 entre sus valores de SAR máximos normalizados. Si a esto se suma la baja tendencia a la formación de agregados observada en los nanocubos estudiados, principal problema que suelen mostrar los sistemas magnéticos de esos tamaños debido a su carácter ferrimagnético, se concluye que, de los dos grandes conjuntos de MNPs sintetizados y estudiados en profundidad en este trabajo, los nanocubos muestran un mayor potencial como agentes de generación de calor en tratamientos de hipertermia que las MNPs esféricas superparamagnéticas tras la internalización celular de los sistemas.

5.2.3. Depuración de medios acuosos contaminados con metales pesados

En este apartado, se efectuaron ensayos con el fin de determinar la capacidad de los sistemas de MNPs de ca. 8.50 nm, sintetizados en el Capítulo 3 de la presente Tesis, de actuar como agentes activos para la eliminación de diferentes metales pesados, tales

como arsénico o mercurio, en disoluciones acuosas mediante procesos de adsorción superficial. Como ya se explicó en el capítulo introductorio, este es uno de los mecanismos más empleados, menos costosos y más efectivos en los procesos de purificación de agua⁵⁶. En el interior de los materiales, todos los enlaces químicos de los átomos constituyentes están completos, cosa que no sucede en su superficie. Por ello, debido a estos enlaces incompletos, a los materiales les resulta energéticamente favorable reaccionar con los compuestos que se encuentren disponibles, produciéndose de este modo los procesos de adsorción superficial de forma espontánea. Como también fue explicado, el interés en el uso de las MNPs en esta aplicación reside, por una parte y una vez llevada a cabo la adsorción del elemento contaminante, en su fácil separación mediante la simple aplicación de un campo magnético y, por otra, en su elevada razón entre superficie y volumen^{57,58}. Esta última característica permite disponer de grandes superficies en la que pueden tener lugar el fenómeno de adsorción empleándose pequeñas cantidades de material adsorbente. Además, las MNPs basadas en óxidos de hierro presentan otras peculiaridades que las convierten en candidatas idóneas, tales como su bajo coste de producción o su muy reducido nivel de toxicidad. Nótese que es importante que el tamaño de la MNPs mantenga un compromiso entre un elevada razón superficie/volumen y la capacidad de ser colectadas fácilmente mediante procesos de centrifugación o, preferiblemente, mediante la aplicación de campos magnéticos, condición esta última⁵⁹ para la cual los tamaños no deben ser excesivamente inferiores a, aproximadamente, 10 nm.

Se analizaron cuatro sistemas magnéticos diferentes; uno de ellos consistente en MNPs de óxido de hierro y los otros tres modificados con dopajes simples con manganeso, zinc y cobalto, respectivamente. Se escogieron MNPs de tamaños semejantes y con grados de dopajes similares con los diferentes elementos a fin de poder comparar el hipotético efecto de estos sobre la capacidad de los sistemas como agentes de depuración. Las imágenes de TEM de las muestras, así como los histogramas de tamaños obtenidos a partir de las mismas y las distribuciones estadísticas de los tamaños hidrodinámicos, determinadas mediante medidas de DLS, se muestran en la Figura 5.25. En la Tabla 5.10, por su parte, se muestran las composiciones de las distintas MNPs, determinadas mediante ICP-MS, así como los valores promedios de los tamaños medidos en las imágenes de TEM y de los diámetros hidrodinámicos.

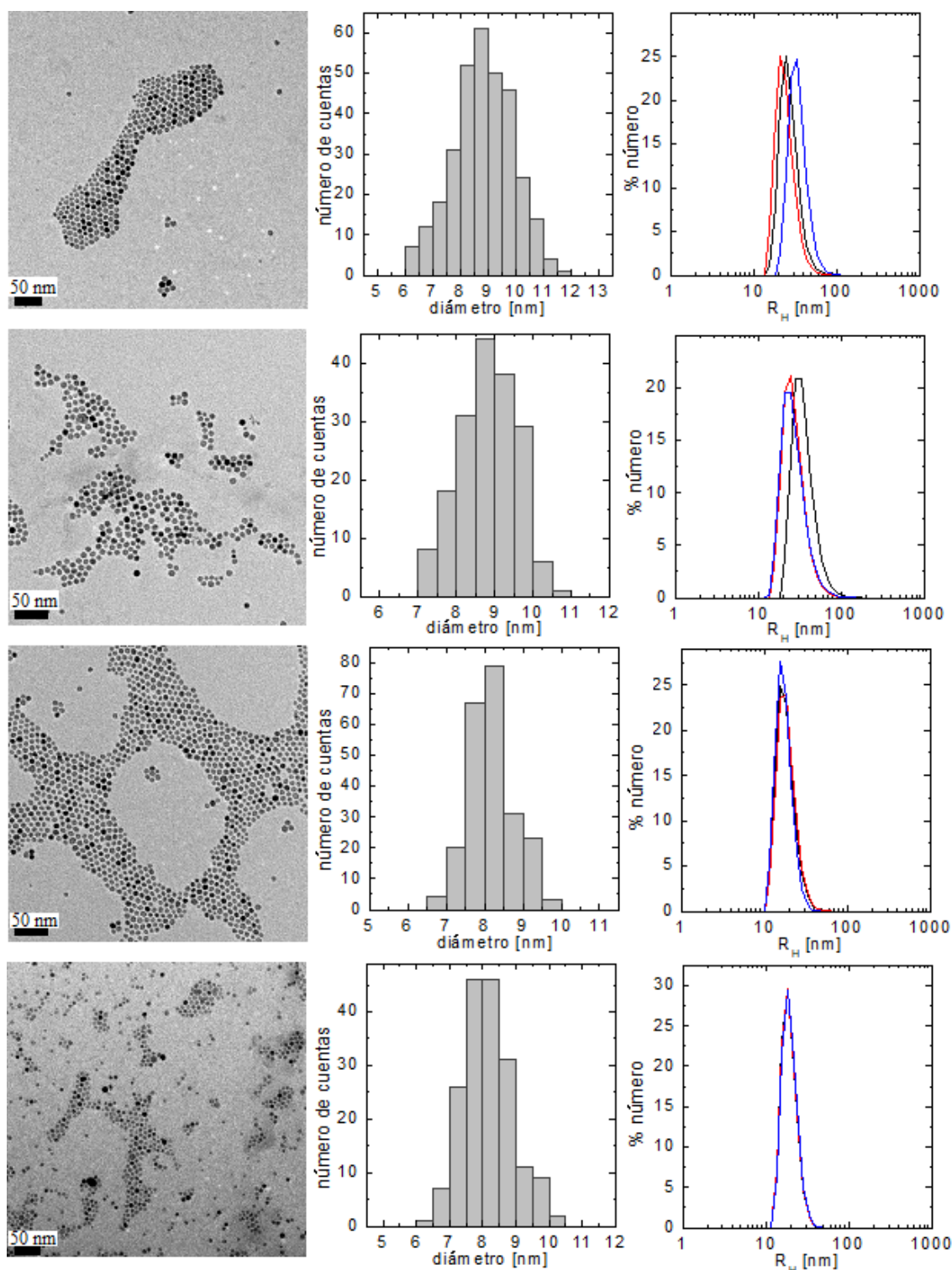


Figura 5.25: Imágenes de TEM, histogramas con las distribuciones estadísticas de tamaño, y distribuciones estadísticas del tamaño hidrodinámico de las muestras de composición: a-c) Fe_3O_4 ; d-f) $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$; g-i) $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$, y j-l) $\text{Zn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$.

Tabla 5.10: Composición, tamaño medido en las imágenes de TEM, y tamaño hidrodinámico de las MNPs empleadas en los ensayos de depuración de metales pesados.

Composición ICP-MS	Tamaño TEM (fase orgánica) [nm]	Diámetro hidrodinámico (fase acuosa) [nm]
Fe ₃ O ₄	8.80 ± 0.93	28.9 ± 9.2
Mn _{0.48} Fe _{2.52} O ₄	8.83 ± 0.74	30 ± 11
Co _{0.55} Fe _{2.45} O ₄	8.19 ± 0.59	28.3 ± 4.8
Zn _{0.65} Fe _{2.35} O ₄	8.18 ± 0.75	19.6 ± 4.1

Se observa que todas las partículas que se usaron en los ensayos de eliminación de metales pesados presentaban tamaños parecidos y, en consecuencia, áreas superficiales similares, presentando en todos los casos unas partes inorgánicas con un diámetro comprendido entre 8.18 y 8.83 nm. Los tamaños hidrodinámicos en fase acuosa, por su parte, son consistentes con los anteriores, y sus mayores valores, como ya fue explicado, proceden del recubrimiento polimérico⁶⁰. Asimismo, también puede comprobarse que, entre todas las ferritas sintetizadas en el Capítulo 3, se escogieron aquellas con grados de dopaje de los tres elementos estudiados lo más similares posible y siempre procurando, como se mencionó con anterioridad, que sus tamaños fuesen muy parecidos.

Los ensayos de eliminación de metales pesados se efectuaron siguiendo el protocolo expuesto en la sección de Materiales y Métodos. Se emplearon disoluciones de contaminantes de diferentes concentraciones hasta un valor máximo de 750 µg·ml⁻¹, evaluando también el efecto del pH en el rango 3-10. Mediante estas condiciones, se ha pretendido estudiar la capacidad de los sistemas de MNPs estudiados como agentes descontaminantes en medios acuosos de diferentes grados de acidez y distintos grados de contaminación con arsénico y/o mercurio.

Los diferentes sistemas magnéticos fueron incubados en el seno de las disoluciones de metales pesados durante 24 h, período tras el cual las MNPs fueron precipitadas. El análisis composicional del sobrenadante, efectuado mediante la técnica de ICP-MS, unido al conocimiento de la concentración de las disoluciones originales, permitió determinar la cantidad de contaminantes que fue eliminada por las MNPs.

También se efectuaron ensayos en ausencia de material magnético para, de este modo, confirmar que la eliminación de los metales pesados es debida a la presencia de las MNPs y, en ningún caso, a la etapa de centrifugación con la que se recolectaron las mismas. En concordancia con gran parte de la bibliografía publicada sobre el tema, las cantidades de metales pesados eliminadas se expresaron en unidad de masa de los mismos por unidad de masa de las MNPs utilizadas como adsorbantes^{61,62}.

5.2.3.1. Depuración de medios acuosos contaminados con arsénico

Las representaciones gráficas correspondientes a los ensayos de eliminación de arsénico con las diferentes MNPs se muestran en la Figura 5.26.

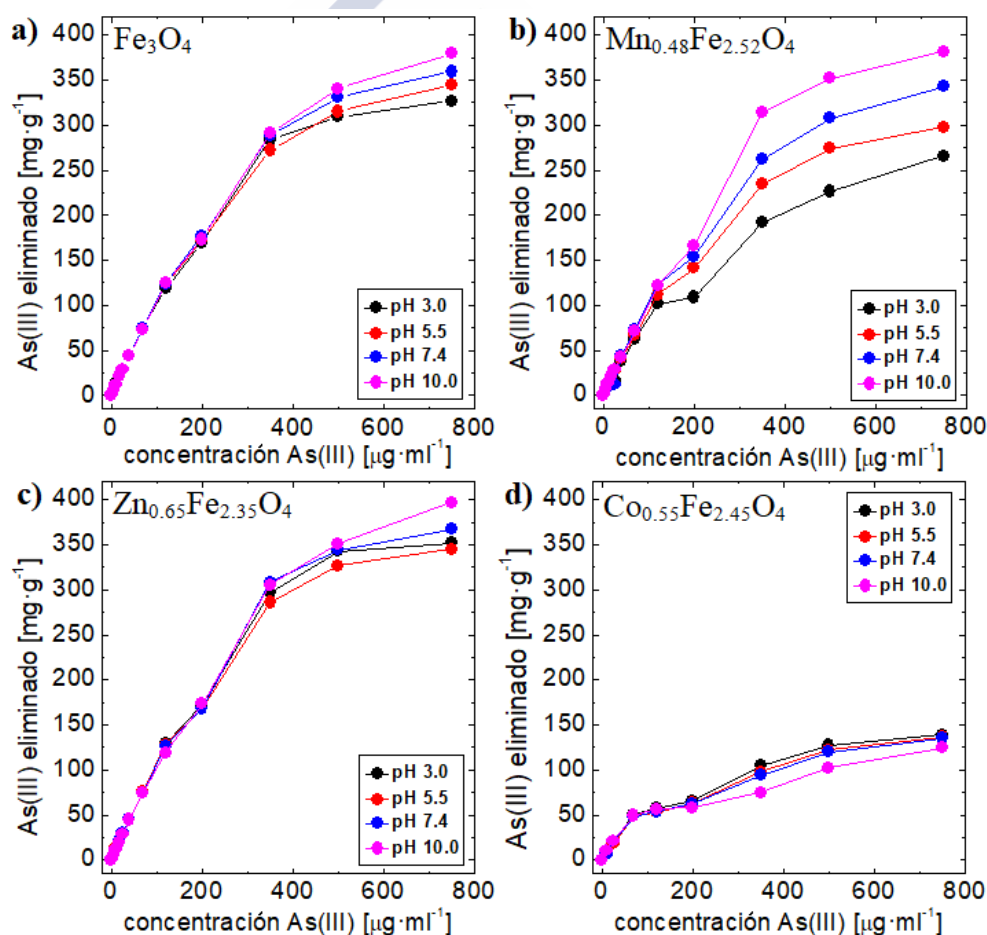


Figura 5.26: Cantidad de As(III) eliminado frente a la concentración del mismo utilizando MNPs de composición: a) Fe₃O₄, b) Mn_{0.48}Fe_{2.52}O₄, c) Zn_{0.65}Fe_{2.35}O₄ y d) Co_{0.55}Fe_{2.45}O₄. Incertidumbre máxima inferior al ±5%.

De cara a observar de forma más clara el efecto de las MNPs sobre la capacidad de depuración, en la Figura 5.27 se muestran las representaciones gráficas de las cantidades de metal pesado eliminadas agrupadas, en esta ocasión, en función del pH.

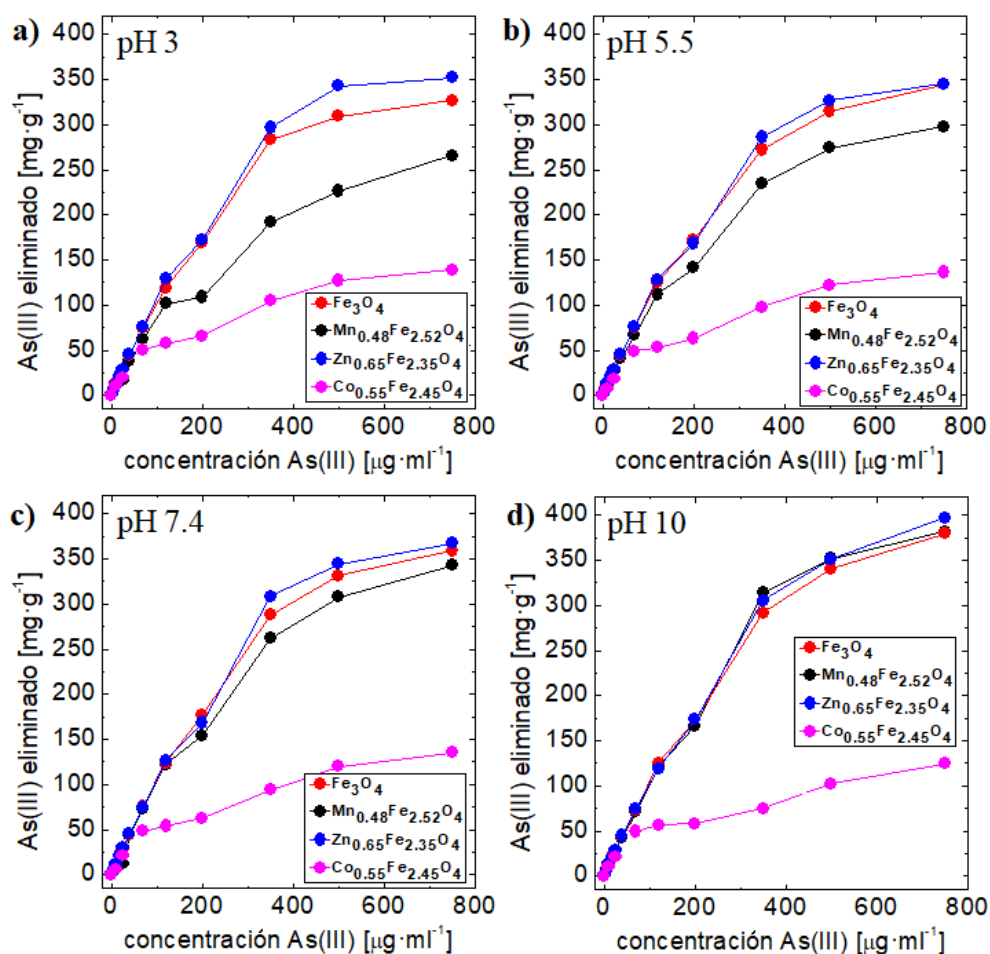


Figura 5.27: Cantidad de As(III) eliminado frente a la concentración del mismo, empleando las distintas MNPs en disoluciones de pH: a) 3.0, b) 5.5, c) 7.4 y d) 10.0. Incertidumbre máxima inferior al $\pm 5\%$.

A partir de las representaciones gráficas anteriores se concluye la existencia de importantes diferencias en la capacidad de eliminación de arsénico tanto entre las diferentes MNPs como a los diferentes pH. Los sistemas de MNPs de óxido de hierro y de MNPs dopadas con zinc son los que presentan un comportamiento más parecido entre ellos. En ambos casos, las cantidades de arsénico eliminado presentan una dependencia pequeña con el pH, especialmente cuando la concentración de arsénico en las disoluciones es reducida. A las concentraciones de contaminante más elevadas,

superiores a $350 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, se observa una capacidad de eliminación del metal ligeramente superior a pH básico, llegando a alcanzarse valores superiores a 400 mg de As(III) por gramo de MNPs a pH 10.

El comportamiento de las MNPs dopadas con manganeso no difiere en exceso del de las anteriores, mostrando como peculiaridad unas importantes diferencias en la capacidad de eliminación a los diferentes pH. Al igual que sucedía antes, a bajas concentraciones de arsénico la cantidad de material eliminado es similar, pero a altas concentraciones las diferencias son mucho más significativas. Así, aunque este sistema mantiene una tendencia similar en mostrar mayor capacidad de descontaminación a pH básico, en esta ocasión se pasa de los aproximadamente $250 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ medidos a pH 3 a los casi $400 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ medidos a pH 10, mientras que en las MNPs dopadas con zinc y en las de óxido de hierro esta diferencia es más leve.

Por último, las MNPs dopadas con cobalto son las que presentan, con mucha diferencia, una menor capacidad de eliminación de arsénico de las disoluciones contaminadas. Mientras que los demás sistemas magnéticos llegaban a conseguir eliminar cantidades en el entorno de $400 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, en los ensayos efectuados con estas MNPs se alcanzaron valores ligeramente inferiores a $150 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Además, al contrario de los que sucedía con las demás NPs, la capacidad de eliminación del metal pesado estudiado semeja ser ligeramente superior en condiciones de mayor acidez, si bien las diferencias entre los datos medidos a los diferentes pH no son excesivamente grandes.

Las representaciones gráficas de las cantidades de arsénico eliminadas agrupadas en función del pH confirman el comportamiento antes descrito. Así, en primer lugar, se observa que a todos los pH estudiados las MNPs dopadas con cobalto eliminan una cantidad de arsénico muy inferior a las demás. Las MNPs sin dopar, las dopadas con zinc y las dopadas con manganeso presentan un comportamiento semejante, siendo sólo destacable la decreciente capacidad de eliminación de las últimas a medida que se disminuye el grado de acidez de las disoluciones.

Cabe destacar, por último, que la práctica totalidad de las curvas representadas muestran una pendiente decreciente a medida que se incrementa la concentración de As(III), aunque sin llegar a presentar una zona claramente plana. Este comportamiento es indicativo de la presumible existencia de un valor de saturación, es decir, de una cantidad máxima de arsénico que puede ser eliminada por las MNPs ensayadas.

En todas las gráficas anteriores se ha representado la cantidad de arsénico eliminada frente a la concentración del mismo en las disoluciones en las que se efectuaron los ensayos. Esta magnitud, la cantidad de metal pesado eliminada, expresada generalmente en unidad de masa por unidad de masa de las MNPs empleadas, es la más habitualmente utilizada en los estudios de esta índole. Sin embargo, además del valor absoluto, también resulta de interés conocer qué porcentaje del compuesto contaminante es eliminado a cada concentración, a cada pH y con cada tipo de sistema magnético. Para obtener dichos porcentajes sólo es necesario calcular el cociente entre la cantidad de arsénico eliminada y la cantidad total que había previa a la incubación con MNPs, ambas determinadas mediante la técnica de ICP-MS. Las gráficas del porcentaje de As(III) eliminado en cada caso se muestran en la Figura 5.28.

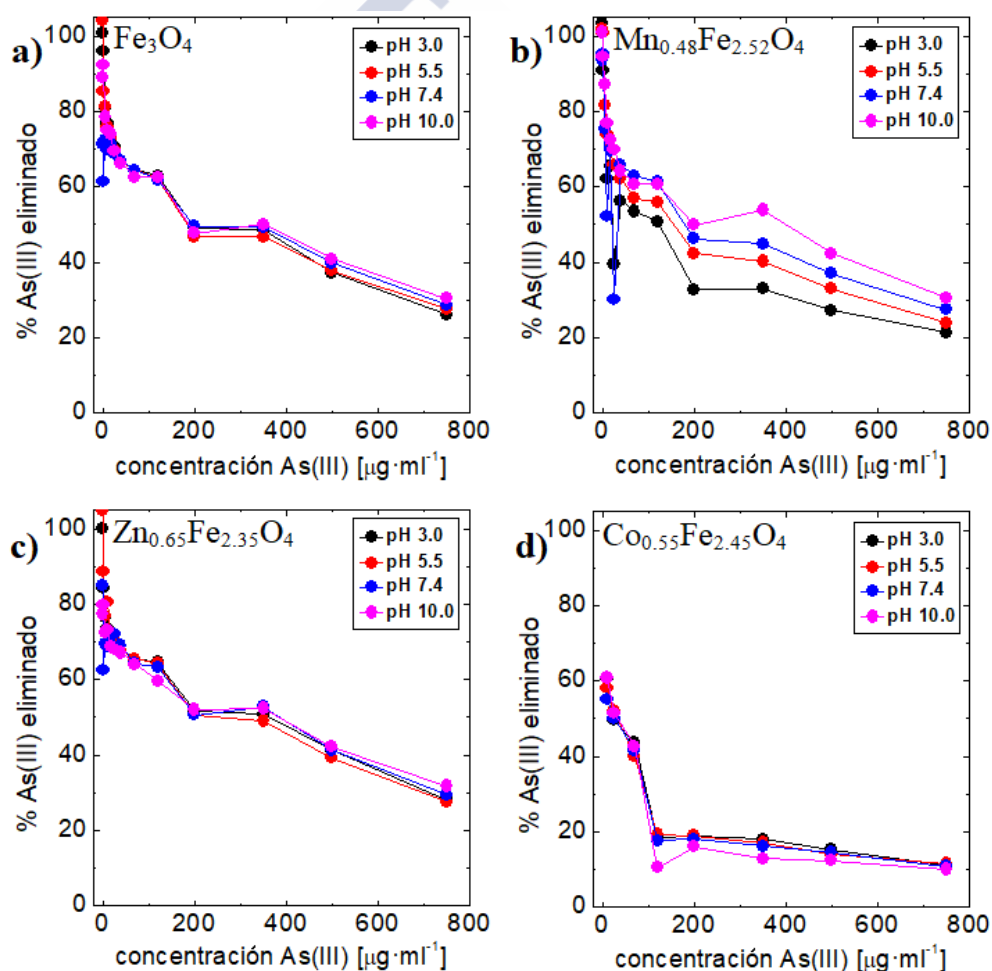


Figura 5.28: Porcentaje de As(III) eliminado frente a la concentración del mismo utilizando MNPs de composición: a) Fe_3O_4 , b) $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, c) $\text{Zn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$ y d) $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$. Incertidumbre máxima inferior al $\pm 5\%$.

La gráfica anterior muestra que la incubación con las MNPs permite la eliminación de la práctica totalidad del arsénico cuando la concentración de este es muy reducida. A partir de concentraciones superiores a aproximadamente $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ el porcentaje de metal pesado eliminado por el método implementado decae, dependiendo del pH y de las MNPs utilizadas, a un valor de entre el 60% y el 80%. A medida que se aumentan las concentraciones, dicho porcentaje continúa decayendo de forma progresiva mostrando unos valores a las concentraciones de arsénico más elevadas de entre el 25% y el 35%. La excepción a este comportamiento, es el de las MNPs dopadas con cobalto, que incluso a bajas concentraciones del metal pesado no presentan una eficiencia de eliminación superior al 60%, decayendo incluso por debajo del 10% a las concentraciones más elevadas.

5.2.3.2. Depuración de medios acuosos contaminados con mercurio

Tras estudiar la capacidad de depuración de las MNPs en medios acuosos contaminados con arsénico, se procedió de forma análoga en medios contaminados con mercurio. Se implementaron idénticas condiciones respecto a las concentraciones del compuesto basado en el metal pesado y a los grados de acidez de los medios, así como los mismos sistemas magnéticos: MNPs de aproximadamente 8.50 nm de diámetro basadas en óxido de hierro modificadas con diferentes elementos dopantes. Al igual que antes, las MNPs fueron incubadas en el seno de los medios contaminados durante 24 h para, a continuación, ser precipitadas, seguido del posterior análisis composicional del sobrenadante que permitió determinar la cantidad de mercurio eliminada. En las Figuras 5.29 y 5.30 se muestran las representaciones gráficas de las cantidades de mercurio eliminadas en las disoluciones de diferente concentración agrupadas en función del tipo de MNPs empleada y del pH, respectivamente, para observar de forma más clara el efecto de cada uno de estos factores.

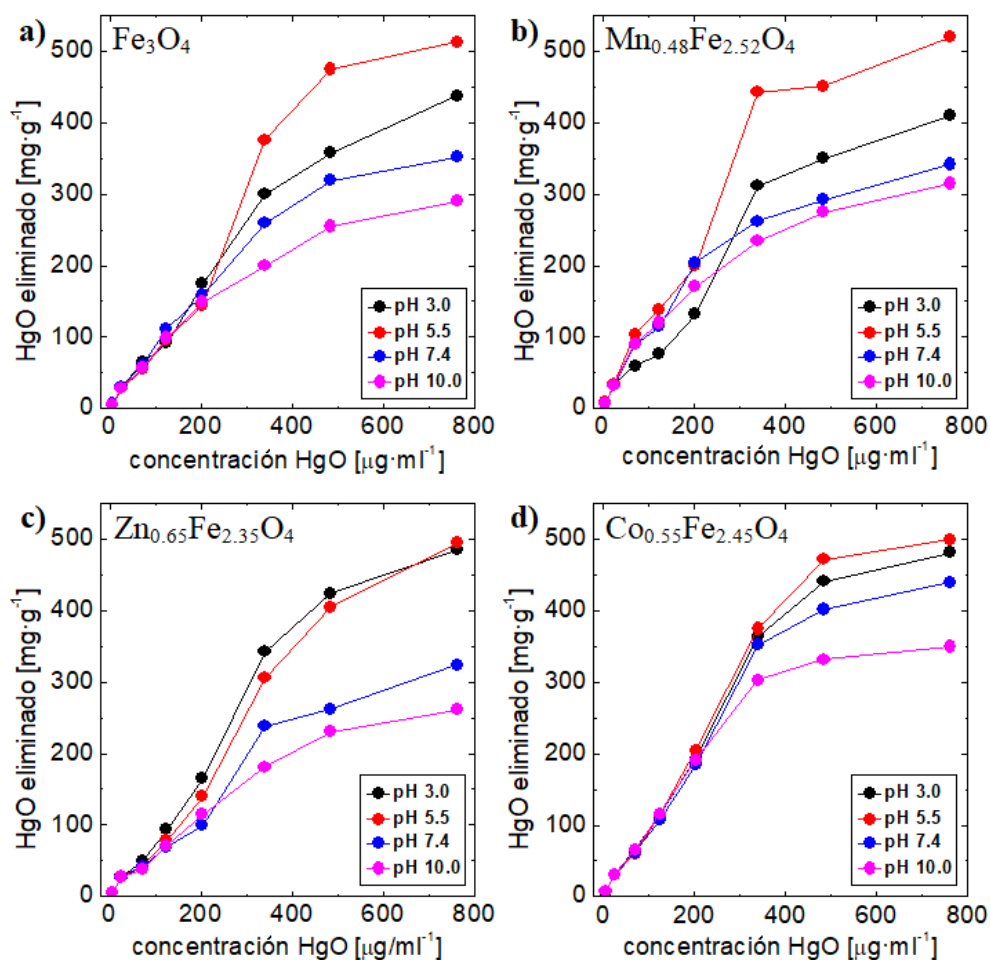


Figura 5.29: Cantidad de HgO eliminado frente a la concentración del mismo utilizando MNPs de composición: a) Fe_3O_4 , b) $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, c) $\text{Zn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$ y d) $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$. Incertidumbre máxima inferior al $\pm 5\%$.

Tal y como se puede observar en la figura previa, y al contrario de lo que sucedía en los ensayos de eliminación de arsénico, todas las MNPs ofrecen unos resultados cualitativamente similares. Así, cuando la concentración de mercurio es baja, los cuatro sistemas magnéticos empleados presentan un grado de eliminación del metal pesado con una dependencia con el pH muy pequeña. A concentraciones superiores a aproximadamente $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sí comienzan a observarse notables diferencias entre los distintos grados de acidez, presentando todas las MNPs estudiadas una capacidad de eliminación de mercurio máxima a pH 5.5, decreciendo esta progresivamente al pasar a pH 3.0, 7.4 y 10.0. Dicho comportamiento no se cumple en el caso de las MNPs dopadas con zinc, para las que la capacidad de eliminación fue máxima a pH 3.0, si bien con muy poca diferencia con respecto a pH 5.5.

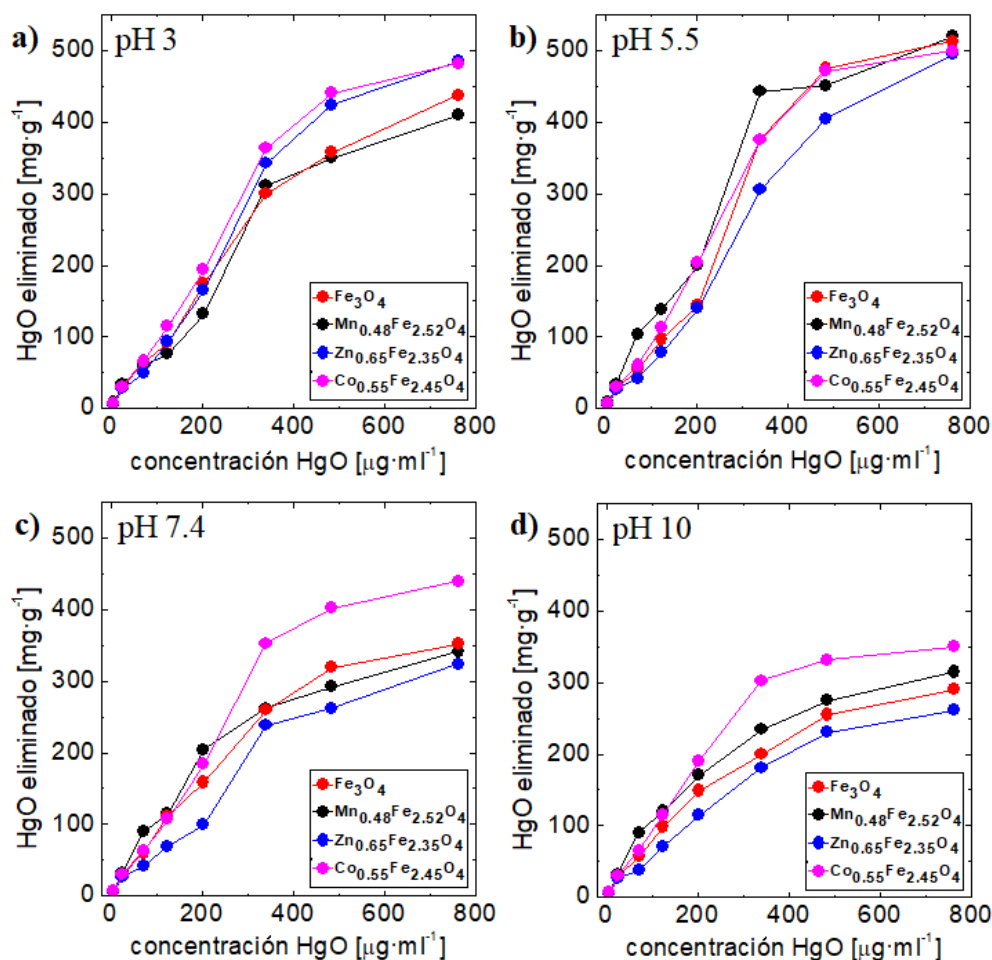


Figura 5.30: Cantidad de HgO eliminado frente a la concentración del mismo, empleando las distintas MNPs en disoluciones de pH: a) 3.0, b) 5.5, c) 7.4 y d) 10.0. Incertidumbre máxima inferior al $\pm 5\%$.

En lo referente a los valores numéricos, a pH 5.5 todos las MNPs estudiadas muestran unos valores máximos de eliminación de mercurio de aproximadamente 500 mg·g⁻¹ a las disoluciones de mercurio de concentración más elevada. Estos decaen con los valores de pH, como se indicó previamente, de modo que a pH 10.0 el grado de eliminación no supera en ninguna de las MNPs los 350 mg·g⁻¹. Las gráficas agrupadas en función del pH muestran que las diferencias entre los distintos sistemas de MNPs son pequeñas, aunque puede observarse que en la mayoría de los pH estudiados el sistema que muestra una mayor capacidad de eliminación es el de MNPs dopadas con cobalto, siendo mínima en las MNPs modificadas con zinc.

Por último, cabe destacar la pendiente decreciente que se observa en la gran mayoría de las representaciones gráficas de la cantidad de mercurio eliminado frente a la concentración del mismo. Este hecho, al igual que sucedía en los estudios con arsénico, es indicativo de la existencia de un valor de saturación, es decir, de un valor máximo de la cantidad de contaminante por unidad de masa de las MNPs implementadas que es posible eliminar.

A semejanza de cómo se hizo en el estudio de eliminación de arsénico, se calculó la cantidad porcentual de mercurio eliminada en cada ensayo efectuado, dando lugar a los datos que se presentan en la Figura 5.31.

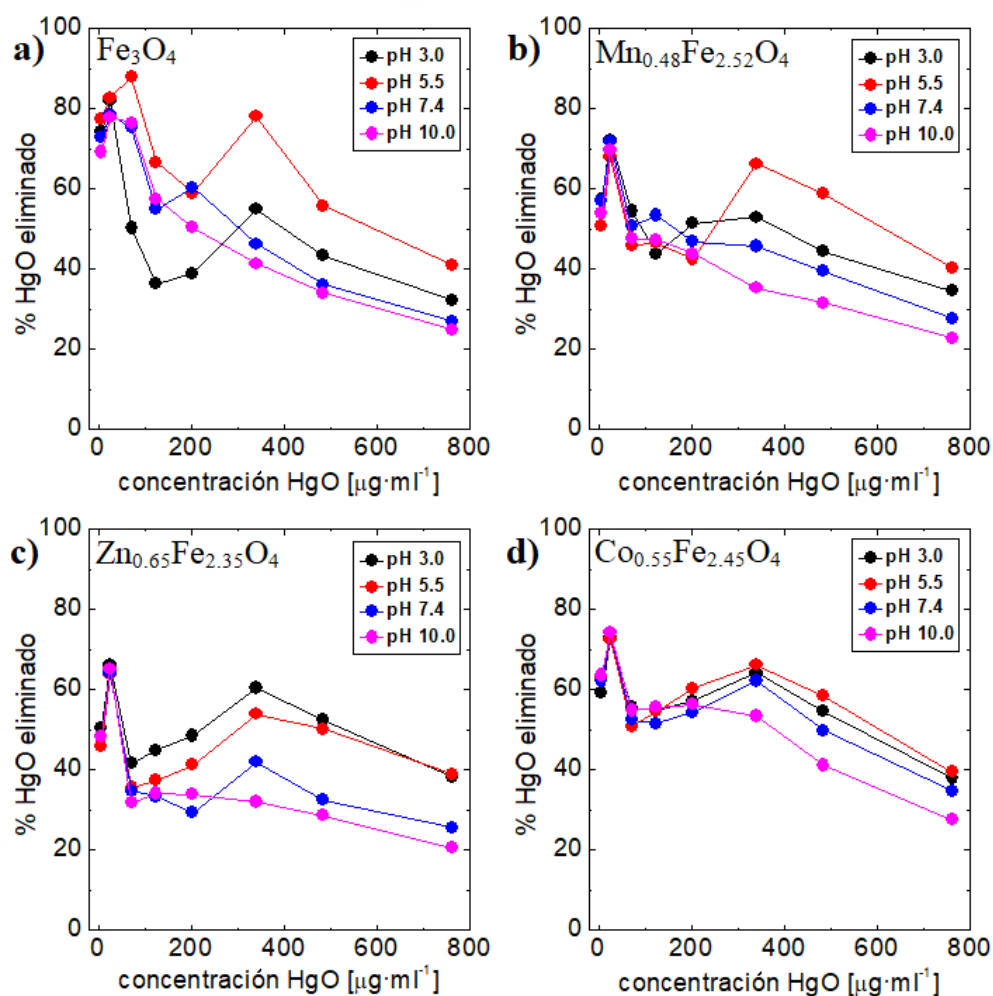


Figura 5.31: Porcentaje de HgO eliminado frente a la concentración del mismo utilizando MNPs de composición: a) Fe_3O_4 , b) $\text{Mn}_{0.48}\text{Fe}_{2.52}\text{O}_4$, c) $\text{Zn}_{0.65}\text{Fe}_{2.35}\text{O}_4$ y d) $\text{Co}_{0.55}\text{Fe}_{2.45}\text{O}_4$. Incertidumbre máxima inferior al $\pm 5\%$.

Al contrario de lo que sucedía con el arsénico, en los ensayos de eliminación de mercurio no se consiguió eliminar el 100% del metal pesado en ningún caso. A concentraciones de contaminante muy bajas, el porcentaje de eliminación del mismo varía entre, aproximadamente, el 50% y el 80% dependiendo del tipo de MNPs empleadas. En este rango de concentraciones reducidas las MNPs de óxido de hierro sin dopar parecen ser las que muestran una mayor eficiencia como agentes remediadores. Al incrementar la concentración de mercurio en las disoluciones, el porcentaje eliminado por las MNPs decae, de modo que a concentraciones elevadas del contaminante la eficiencia de todas las partículas se encuentra entre el 25% y el 40%. En este rango de concentraciones elevadas, como ya se indicó con anterioridad, las variaciones entre los efectos de las diferentes MNPs son menores, siendo el pH un factor más determinante en las diferencias existentes. El descenso en los porcentajes de la cantidad de mercurio eliminada al aumentar la concentración no es continuo, observándose algunos picos en las gráficas. Estos pueden ser atribuidos al estrecho rango de valores entre los que varían dichos porcentajes en comparación con los valores obtenidos con el arsénico.

5.2.3.3. Depuración de medios acuosos contaminados con arsénico y mercurio

A continuación, se estudió la capacidad de depuración de los sistemas magnéticos en medios contaminados simultáneamente con los dos metales pesados previamente ensayados: arsénico y mercurio. En este caso, se empleó solamente un tipo de MNPs, concretamente las de óxido de hierro sin dopar, y el estudio se llevó a cabo a dos valores de pH diferentes; 5.5 y 10.0. Se siguió el mismo protocolo que en las pruebas efectuadas en los apartados previos, utilizando disoluciones que contenían los compuestos contaminantes en las concentraciones habituales.

La limitación de los ensayos a solo un tipo de MNPs respondió a las reducidas diferencias observadas entre los resultados proporcionados por los distintos sistemas magnéticos en los experimentos previos, mientras que los dos valores de pH utilizados se corresponden con aquellos en los cuales las MNPs mostraban sus capacidades máximas de eliminación de mercurio y arsénico, respectivamente.

En la Figura 5.32 se muestran las representaciones gráficas de las cantidades de contaminantes eliminadas en las disoluciones a diferentes concentraciones de los mismos bajo las distintas condiciones ensayadas.

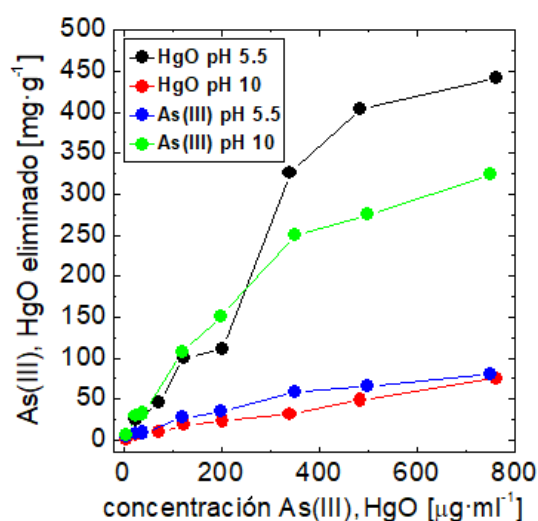


Figura 5.32: Cantidades de As(III) y HgO eliminadas frente a la concentración de los mismos utilizando MNPs de composición Fe_3O_4 . Incertidumbre máxima inferior al $\pm 5\%$.

A pH 5.5 las MNPs muestran una mayor capacidad de eliminación de mercurio que de arsénico, comportamiento que cambia cuando las disoluciones se encuentran a pH 10. Así, a pH 5.5 las MNPs presentan una capacidad de adsorción de HgO máxima, dentro del rango de concentraciones estudiado, superior a $400 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, mientras que en el caso del As(III) esta apenas alcanza los $100 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Con respecto a los valores máximos de metales pesados eliminados que se midieron en las disoluciones contaminadas con mercurio y arsénico individualmente, estos cayeron apenas un 20% en el caso del mercurio y casi un 80% en el caso del arsénico. De este modo, queda patente la mayor capacidad de adsorción superficial del primero con las MNPs utilizadas cuando el pH presenta un valor de 5.5.

A pH 10, en cambio, las máximas cantidades adsorbidas fueron superiores a $300 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para el As(III) e inferiores a $100 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ en el caso del HgO. En la comparación porcentual con los datos obtenidos en las disoluciones contaminadas con arsénico y mercurio de forma individual, estos suponen un descenso ligeramente inferior al 15% en la eliminación de As(III) y cercana al 75% para el HgO, respectivamente. Así pues, cuando el pH de las disoluciones de metales pesados toma un valor 10.0 parece

demostrarse que las MNPs muestran una mayor capacidad de adsorción superficial de arsénico que de mercurio.

Procediendo de igual forma que en los apartados previos, se calculó a qué porcentaje de las cantidades de metales pesados totales correspondían los datos de adsorción bajo cada una de las condiciones ensayadas (Figura 5.33).

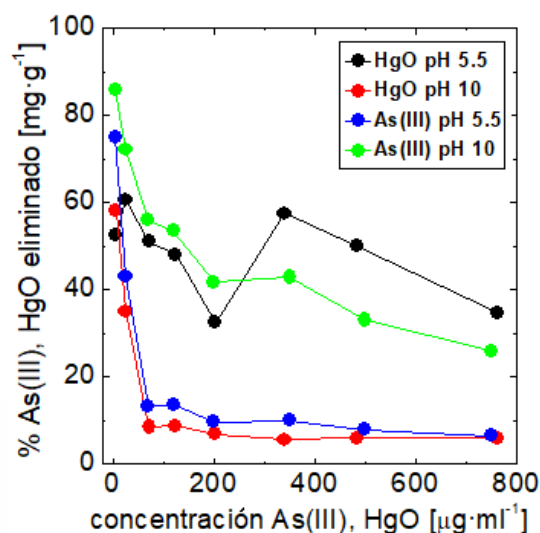


Figura 5.33: Porcentajes de As(III) y HgO eliminado frente a las concentraciones de los mismos utilizando MNPs de composición Fe_3O_4 . Incertidumbre máxima inferior al $\pm 5\%$.

De este modo, se confirma que los porcentajes de As(III) y HgO eliminados a pH 10 y a pH 5.5, respectivamente, sólo disminuyen ligeramente en las disoluciones contaminadas con ambos metales respecto a los determinados en las disoluciones individuales de cada uno de los metales pesados, siendo incluso superiores en algunos casos. Así, a bajas concentraciones de contaminantes las MNPs son capaces de adsorber cantidades próximas al 80% de As(III) a pH 10 y al 60% del HgO a pH 5.5, valores no muy inferiores a los medidos en las disoluciones individuales de cada uno de ellos. En el caso del As(III) a pH 5.5 y del HgO a pH 10, en cambio, las MNPs adsorben un elevado porcentaje de los mismos cuando están presentes en muy bajas concentraciones, pero en ambos casos estos decaen a aproximadamente un 5-10% cuando su concentración es superior a aproximadamente $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.2.3.4. Análisis del efecto del pH del medio y de la tipología de las MNPs en la adsorción de metales pesados

Se ha comprobado que las MNPs empleadas en los ensayos de depuración consiguen eliminar grandes cantidades de los dos metales pesados estudiados: arsénico y mercurio. No existen un gran número de trabajos publicados acerca de la eliminación de mercurio mediante el uso de nanopartículas, pero sí se ha abordado de forma extensa el tratamiento de agua contaminada con arsénico con nanoplateformas de esta naturaleza. La comparación con estos últimos estudios muestra que los sistemas de MNPs sintetizados en el presente trabajo muestran un gran interés como potenciales agentes descontaminantes, llegándose a medir capacidades de eliminación de arsénico superiores a 400 mg de As(III) por cada gramo de MNPs utilizado. Nótese, además, que las curvas mostradas en páginas anteriores aún no se encontraban completamente en régimen de saturación, por lo que, presumiblemente, los valores máximos de extracción deben ser superiores. Esta capacidad de biorremediación de medios contaminados por arsénico es notablemente superior a, por ejemplo, la obtenida en los estudios efectuados por Cheng *et al.*⁶¹, cuyos sistemas de MNPs solo conseguían eliminar un máximo de 46.4 mg·g⁻¹ de As(III), alcanzando estos el régimen saturado a concentraciones del contaminante inferiores a 40 µg·ml⁻¹. Balcells *et al.*⁶², por su parte, desarrollaron MNPs cuya máxima capacidad de eliminación de As(III) era de aproximadamente 320 mg·g⁻¹. Además, es importante tener en cuenta que, como se mencionó en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, el As(III) en muchas ocasiones necesita de una etapa previa de pre-oxidación de cara a favorecer su posterior eliminación mediante el uso de sistemas nanoparticulados⁶³, lo cual suele conllevar un aumento en la complejidad y en el coste de los tratamientos. En este estudio se lograron altos índices de eliminación de este contaminante sin necesidad de dicha etapa de oxidación, lo cual supone un importante avance desde el punto de vista logístico y económico.

Como se mencionó previamente, son pocos los estudios llevados a cabo sobre el tratamiento de medios contaminados con mercurio empleando sistemas coloidales, lo cual dificulta la valoración de los resultados obtenidos en los ensayos efectuados. Chiarle *et al.*⁶⁴, por ejemplo, lograron eliminar cantidades de mercurio cercanas a 400 mg·g⁻¹, aunque sus nanosistemas saturaban a concentraciones del contaminante muy bajas. Para tal fin usaban resinas de poliestireno-divinilbenceno, sistemas de naturaleza muy diferentes a las MNPs implementadas en el presente estudio, lo cual hace que no

sea posible establecer una comparación directa entre los resultados. Sin embargo, sí sirve para valorar de forma cualitativa los datos medidos en los ensayos efectuados, superiores en algunos casos a $500 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, como positivos.

Los resultados obtenidos en los ensayos con arsénico y mercurio dan pie a pensar que, empleando una mayor cantidad de MNPs, se podría conseguir un 100% de eliminación de contaminantes incluso a concentraciones elevadas de los mismos. Como contrapartida, el aumento de la masa de material magnético puede dificultar su completa recolección y eliminación una vez efectuada la incubación. Se trata, sin embargo, de pruebas que deben ser efectuadas de forma específica, dado que la capacidad de adsorción superficial de las MNPs no tiene por qué ser necesariamente escalable al aumentar la cantidad de las mismas.

Nótese que el peso molecular del arsenito (As(III)) es ligeramente inferior al del óxido de mercurio, (198 y $217 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, aproximadamente) por lo que, el hecho de que la masa de contaminante eliminada en los ensayos con mercurio sea ligeramente superior a la eliminada en los ensayos con arsénico implica que el número de moléculas de contaminante atrapadas por las MNPs es semejante en ambos casos, de lo que se concluye un comportamiento similar de los sistemas magnéticos como agentes descontaminantes de los dos metales pesados estudiados.

Las diferencias observadas entre los distintos sistemas de MNPs ensayados no permiten extraer conclusiones claras acerca del hipotético efecto de la composición de la parte inorgánica de los mismos sobre su capacidad de depuración. Más que al dopaje con los diferentes elementos, las pequeñas disparidades de comportamiento probablemente puedan ser debidas a las sutiles diferencias de tamaño existentes entre las MNPs y/o al espesor y homogeneidad de sus recubrimientos poliméricos, también ligeramente diferentes como se comprueba a través de las pequeñas diferencias entre sus tamaños hidrodinámicos. En este sentido, los muy bajos índices de eliminación de arsénico obtenidos al implementar el sistema de MNPs dopadas con cobalto pueden derivarse de fenómenos de agregación y/o pérdida de estabilidad coloidal de estas MNPs. El hecho de que las demás MNPs presenten comportamientos muy similares entre ellas en los ensayos con arsénico, así como el muy parecido comportamiento de los cuatro sistemas en los ensayos con mercurio, dan pie a pensar en dichas opciones como la posible causa de los resultados anómalos.

El efecto del pH sobre el grado de adsorción de los agentes contaminantes se asocia a la capacidad de este parámetro de modificar la carga superficial de las MNPs mediante la protonación de las terminaciones OH existentes en la superficie de las mismas tras su recubrimiento con el complejo PMA-dodecilamina. Asimismo, dependiendo del punto isoeléctrico de las moléculas contaminantes, el pH también puede modificar la carga de estas⁶⁵, favoreciendo o perjudicando de este modo la capacidad de adsorción. De este modo, se ha comprobado que las MNPs sintetizadas recubiertas con el complejo polimérico presentan una distribución de potencial ζ con un valor promedio nulo a un valor de pH de aproximadamente 5.0. Por encima del mismo, como ya se ha comentado en capítulos previos, la carga es negativa, mientras que a valores inferiores torna positiva. Las moléculas de contaminante basadas en arsénico, por su parte, presentan un punto isoeléctrico próximo a pH 10, por lo que en todos los pH estudiados su carga fue positiva⁶¹, lo cual explica que el grado de adsorción a la superficie de las MNPs disminuyese a medida que lo hacía el pH, siendo mínimo a pH 3 donde tanto las MNPs como las moléculas del adsorbente presentaban carga positiva. En el caso del compuesto contaminante basado en mercurio, el punto isoeléctrico es de aproximadamente 7, lo cual explica que la máxima adsorción tenga lugar a pH 5.5 dado que a ese grado de acidez adsorbente y adsorbente presentan cargas de signos opuestos⁶⁶. Estos comportamientos descritos acerca de la capacidad de eliminación de As(III) y HgO en función del pH de las disoluciones de metales pesados se hacen especialmente evidentes en los ensayos efectuados con disoluciones modificadas simultáneamente con ambos compuestos, llevados a cabo en el apartado anterior.

Finalmente, cabe mencionar que las medidas de ICP-MS de los sobrenadantes también sirvieron para constatar que la eliminación de contaminantes tuvo lugar, tal y como se supuso en todo momento, por un proceso de adsorción superficial. La pequeña cantidad de MNPs que permanecieron en disolución tras el proceso de centrifugación mostraban unas razones entre las cantidades de metales acordes con las composiciones previamente establecidas, confirmándose así que no tuvo lugar ningún fenómeno de sustitución de dichos metales por los iones de los elementos contaminantes en la estructura interna de las MNPs. Dicha sustitución era complicada en el caso del mercurio, con elevado peso y radio atómico, pero no así en el caso del arsénico, cuyo tamaño es inferior al de todos los metales que forman parte de la estructura de las diferentes MNPs⁶⁷. Sin embargo, como se mencionó previamente, los análisis

composicionales de las MNPs residuales de los sobrenadantes descartaron esta fenomenología y confirmaron la adsorción superficial de mercurio y arsénico.

5.2.3.5. Modelización de las isotermas de adsorción de metales pesados sobre las MNPs

Finalmente, se ha determinado si los datos de adsorción superficial medidos en los diferentes sistemas de MNPs, a cada uno de los pH estudiados y con los dos compuestos contaminantes analizados, obedecen al modelo de adsorción de Langmuir. Dicho modelo se basa en la hipótesis de que la superficie adsorbente es homogénea y en la misma sólo se constituye una única monocapa adsorbida, sin considerar la intervención de fuerzas intermoleculares⁶⁸. La adsorción alcanza finalmente un equilibrio que es descrito por la ecuación 5.4.

$$Q_e = Q_m \cdot \frac{b \cdot C_e}{1 + b \cdot C_e} \quad (5.4)$$

dónde C_e es la concentración de las disoluciones de metales pesados en equilibrio, Q_e es la cantidad de metales pesados adsorbida por unidad de masa de MNPs, Q_m es la máxima capacidad de adsorción de las MNPs, y b es la constante de adsorción de Langmuir.

Por lo tanto, el ajuste no lineal de los valores de las cantidades de metales pesados adsorbidas frente a las concentraciones de los mismos permite obtener la constante de adsorción de Langmuir (b), así como el valor de saturación de la capacidad de adsorción de cada sistema de MNPs a cada pH, es decir, la mayor cantidad de metales pesados que pueden adsorberse en su superficie libre (Q_m)⁶¹. En la Tabla 5.11 se muestran los valores de los dos parámetros de ajuste de la ecuación de adsorción de Langmuir obtenidos en cada uno de los ensayos, así como los coeficientes de correlación (R). Por su parte, en la Figura 5.34 se muestran, a modo de ejemplo, los ajustes efectuados según la ecuación de adsorción de Langmuir a los datos experimentales correspondientes a la eliminación de arsénico con las MNPs de composición $Mn_{0.48}Fe_{2.52}O_4$ y de mercurio con las MNPs de composición Fe_3O_4 .

Tabla 5.11: Coeficientes de correlación y valores de los parámetros de ajuste a la isoterma de Langmuir en los ensayos de eliminación de metales pesados.

	ARSÉNICO				MERCURIO			
	pH	Q_m [mg/g]	B [l/g]	R	pH	Q_m [mg/g]	B [l/g]	R
Fe_3O_4	3.0	516.4	2.72	0.990	3.0	970.2	1.14	0.989
	5.5	550.1	2.47	0.996	5.5	1391.3	0.87	0.951
	7.4	592.3	2.32	0.994	7.4	630.8	1.84	0.988
	10.0	653.7	2.02	0.995	10.0	473.1	2.20	0.997
$Mn_{0.48}Fe_{2.52}O_4$	3.0	430.3	2.18	0.993	3.0	972.7	1.05	0.953
	5.5	473.9	2.49	0.995	5.5	960.6	1.75	0.952
	7.4	578.4	2.11	0.994	7.4	495.3	3.05	0.991
	10.0	678.5	1.96	0.990	10.0	451.3	3.11	0.998
$Zn_{0.65}Fe_{2.35}O_4$	3.0	516.5	2.72	0.990	3.0	1236.3	0.93	0.968
	5.5	550.1	2.47	0.996	5.5	1525.3	0.52	0.974
	7.4	592.3	2.32	0.994	7.4	789.3	0.98	0.964
	10.0	653.7	2.02	0.995	10.0	506.3	1.52	0.988
$Co_{0.55}Fe_{2.45}O_4$	3.0	190.0	3.59	0.977	3.0	1005.4	1.37	0.970
	5.5	192.9	3.15	0.978	5.5	1070.0	1.33	0.963
	7.4	186.5	3.29	0.976	7.4	869.6	1.55	0.963
	10.0	148.1	4.43	0.951	10.0	569.5	2.55	0.971

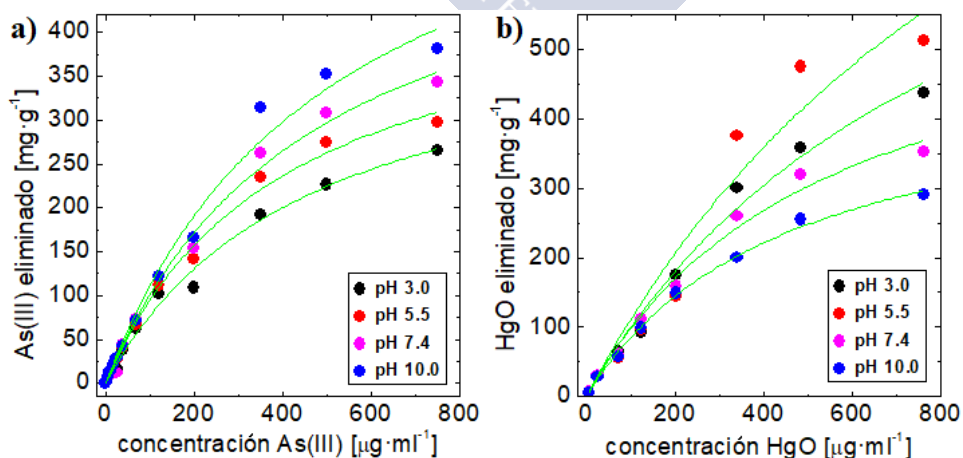


Figura 5.34: Modelización del proceso de adsorción según la isoterma de Langmuir (en verde) en los ensayos de a) eliminación de As con MNPs de composición $Mn_{0.48}Fe_{2.52}O_4$, y b) eliminación de Hg con MNPs de composición Fe_3O_4 . Incertidumbre máxima inferior al $\pm 5\%$.

A partir de la Tabla anterior se comprueba que gran parte de los conjuntos de datos obtenidos en los ensayos de eliminación de metales pesados obedecen la ecuación de adsorción de Langmuir. De este modo, se observa que los ajustes de los datos experimentales correspondientes al arsénico presentan un coeficiente de correlación superior a 0.99, lo cual es indicativo de que los valores experimentales obedecen de forma muy fiel la citada isoterma de adsorción⁶⁹. Los únicos coeficientes de correlación que presentan un valor ligeramente más reducido son los correspondientes a las MNPs dopadas con cobalto, cuya baja capacidad de adsorción y anómala dependencia con el pH ya fue atribuida previamente a posible problemas de agregación.

En los experimentos de eliminación de mercurio, por su parte, se observan varias series de datos en las que los coeficientes de correlación de sus ajustes son ligeramente inferiores a los determinados en los ensayos con arsénico. Sin embargo, en ningún caso son lo suficiente bajos como para considerar que los datos no obedecen de forma muy aproximada la ecuación de Langmuir, siendo el valor superior a 0.96 en la práctica totalidad de los casos. La inferior calidad de estos ajustes se atribuye principalmente a que, como fue comentado con anterioridad, el intervalo de concentraciones estudiado da lugar a unas curvas de adsorción de mercurio que semejan estar más alejadas de sus zonas de saturación que las de arsénico. De esta forma, la ausencia de puntos experimentales muy próximos a la zona de saturación impide determinar de forma precisa las curvas de ajuste, lo que se traduce en una disminución de los valores de los coeficientes de correlación. En aquellas series de datos que peor se ajustaban a la ecuación de adsorción de Langmuir, se probaron sus ajustes a las isothermas de adsorción de Freundlich⁷⁰ y BET⁷¹, dando lugar estas a unos coeficientes de correlación muy bajos, inferiores a 0.90 en algunos casos, quedando demostrado que la isoterma de adsorción de Langmuir es la que mejor describe los resultados obtenidos.

Por otra parte, como también fue mencionado previamente, el valor del parámetro Q_m resultante del ajuste de los datos experimentales a la isoterma de Langmuir se corresponde con la máxima capacidad de adsorción de cada sistema a las diferentes condiciones ensayadas. Dicho parámetro está expresado, en consonancia con todos los experimentos realizados en este apartado, en miligramos de contaminante adsorbidos por gramo de MNPs. Así, se puede observar que la máxima capacidad de adsorción de los sistemas magnéticos implementados es de casi 700 mg/g (pH 10) en las disoluciones contaminadas con arsénico, y de hasta 1500 mg/g (pH 5.5) en las

disoluciones contaminadas con mercurio, valores notablemente superiores a los medidos en los experimentos efectuados. Esto confirma que el rango de concentraciones de las disoluciones de metales pesados ensayadas se encontraba relativamente alejado de la zona de saturación, especialmente en el caso del mercurio.

Debe considerarse también que estos valores de saturación, muy especialmente en el caso del mercurio, pueden estar ligeramente sobreestimados dada la ausencia de suficientes datos experimentales en la zona de saturación, con la consecuente menor precisión de las curvas de ajuste, cuestión ya antes comentada. Además, es importante hacer notar que estas capacidades máximas de adsorción se producirían en disoluciones con una concentración muy elevada de metales pesados. Sin embargo, en la gran mayoría de los sistemas contaminados con estos compuestos en la naturaleza^{72,73}, sobre los que se centran las aplicaciones de los tratamientos industriales de biorremediación, la concentración de los mismos suele estar en el orden de unas pocas decenas de $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. De este modo, la capacidad de adsorción de los sistemas magnéticos dentro del rango de concentraciones de contaminantes estudiada experimentalmente resulta si cabe más importante que la determinación de su capacidad de adsorción máxima mediante la modelización efectuada.

5.2.3.6. Cinéticas de adsorción de los metales pesados

Tras determinar las cantidades de contaminantes adsorbidas por los nanosistemas magnéticos bajo diferentes condiciones tras 24 h de incubación y la modelización de las isothermas obtenidas a la ecuación de adsorción de Langmuir, en este apartado se ha llevado a cabo un estudio de la evolución temporal (cinética) de tales procesos. Para ello, se prepararon disoluciones de los compuestos basados en arsénico y mercurio a varias de las concentraciones previamente ensayadas. Tras añadir las MNPs a estas disoluciones, se determinaron las cantidades de contaminantes adsorbidas a distintos tiempos de incubación, siguiendo el protocolo habitual de precipitación de las MNPs y análisis composicional del sobrenadante mediante ICP-MS. Con estas medidas se puede evaluar el mecanismo de adsorción de los contaminantes sobre la superficie de las MNPs y el ritmo al que esta se produce.

Después de comprobar las escasas diferencias entre los resultados asociados a las distintas tipologías de MNPs ensayadas en los apartados previos, en esta ocasión únicamente se analizaron las MNPs sin dopaje, de composición Fe_3O_4 . Así, se estudiaron las cinéticas de adsorción de As(III) en disoluciones con concentración de contaminante de 70, 120 y 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pH 10, así como de HgO en disoluciones de idénticas concentraciones a pH 5.5. Los tiempos de incubación tras los que se determinaron las cantidades de contaminantes adsorbidas en la superficie de las MNPs, por su parte, son los mostrados en la Tabla 5.12.

Tabla 5.12: Tiempos de incubación ensayados en los estudios de las cinéticas de adsorción de As(III) y HgO sobre la superficie de las MNPs.

Tiempos [h]	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
	4.0	5.0	6.0	7.5	9.0	12	14	24

En la Figura 5.35 se muestran las representaciones gráficas de las cinéticas de adsorción de los compuestos contaminantes basados en arsénico y mercurio a las diferentes condiciones de concentración y pH ensayadas.

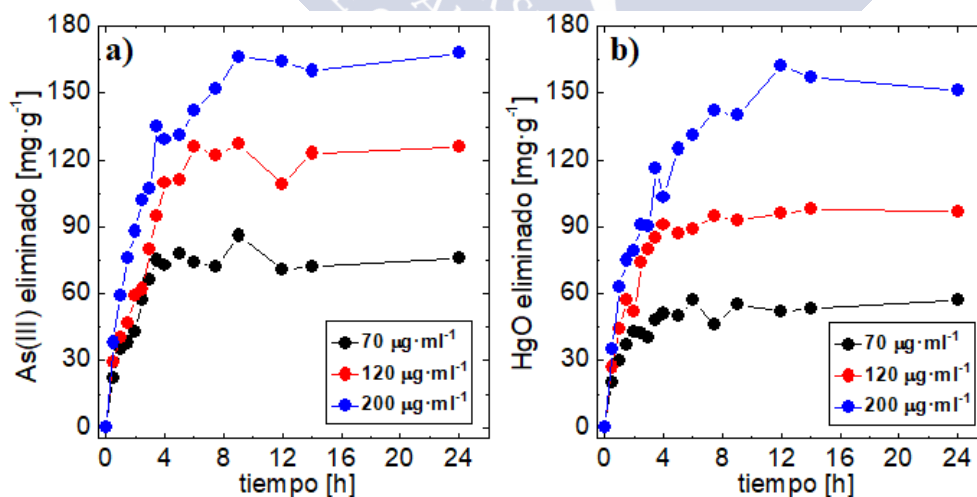


Figura 5.35: Cinéticas de adsorción de contaminantes en disoluciones acuosas de a) As(III) a pH 10 y b) HgO a pH 5.5. Incertidumbre máxima inferior al $\pm 6\%$.

Se puede observar en la Figura anterior que el perfil de las curvas de las cinéticas de adsorción es muy similar en todos los casos: la cantidad de agentes contaminantes adsorbidos a la superficie de las MNPs aumenta rápidamente en las primeras horas de incubación, haciéndose progresivamente más sostenido hasta que la cantidad de metales pesados eliminada por el sistema magnético alcanza un cierto valor de saturación. De esta forma, en las disoluciones de As(III) de concentraciones 70, 120 y 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pH 10 estos valores de saturación o capacidad máxima de adsorción superficial de las MNPs fueron de aproximadamente 75, 125 y 170 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, estando en franca consonancia con los resultados obtenidos en los ensayos previamente efectuados, en los que se determinó la capacidad de depuración de estas mismas MNPs en disoluciones de idénticas características tras 24 h de incubación. Los tiempos de incubación tras los cuales se alcanzaron estos valores de saturación fueron de aproximadamente 3 h en la disolución de concentración 70 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, entre 5 y 6 h en la de concentración 120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y 8 h en la disolución de mayor concentración implementada, respectivamente.

Por su parte, en las disoluciones de HgO los valores de saturación que se obtuvieron también se mostraron en franco acuerdo con los previamente determinados en los ensayos típicos de adsorción tras 24 h de incubación, mostrando en este caso las MNPs estudiadas unas capacidades máximas de adsorción de aproximadamente 60, 100 y 150 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ en las disoluciones de contaminante con una concentración de 70, 120 y 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Por su parte, los tiempos de incubación tras los cuales se alcanzaron estos regímenes saturados fueron, de forma aproximada, 2.5 h, 4 h y 7 h en cada caso. Nótese que la determinación precisa del tiempo de incubación tras el que el sistema magnético estudiado alcanza el régimen saturado bajo cada condición no es sencilla, dado que algunas de las curvas presentan pequeños puntos de inflexión que dificultan fijar esta magnitud de forma exacta.

El estudio de la evolución temporal de la adsorción de contaminantes en la superficie libre de los sistemas magnéticos, bajo las diferentes condiciones de concentración y pH de las disoluciones implementadas, nos permite extraer varias conclusiones. En primer lugar, se observa que los nanosistemas magnéticos alcanzan un régimen de saturación de adsorción de contaminantes en su superficie tras periodos de incubación sensiblemente inferiores a 24 h, tiempo típicamente empleado en los ensayos de depuración llevados a cabo en este Capítulo. Esta rápida adsorción es prueba

fehaciente de la fuerte afinidad de las moléculas de los compuestos contaminantes por la superficie de las MNPs con el recubrimiento polimérico a los pH implementados. En segundo lugar, los datos experimentales obtenidos muestran que, tanto en las disoluciones de mercurio como en las de arsénico, el tiempo necesario para alcanzar el régimen de saturación es menor cuanto más pequeña es la concentración de contaminantes. Así, por ejemplo, en las disoluciones de concentración $70 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, el tiempo necesario para que las MNPs utilizadas muestren su máxima capacidad de adsorción tanto de mercurio como de arsénico es de apenas 3 h. Nótese que esta es una concentración relativamente elevada en comparación con los niveles de contaminación que suelen mostrar los sistemas reales en la naturaleza^{72,73}, por lo que sería de esperar que a las concentraciones típicas en el medio natural el tiempo necesario que las MNPs alcanzasen el régimen saturado sería incluso menor.

Para finalizar, el ajuste de las curvas de las cinéticas de adsorción obtenidas puede proporcionar información acerca del mecanismo de adsorción de los contaminantes a la superficie de las MNPs. Para ello, los datos experimentales fueron ajustados a la ecuaciones de un modelo cinético de primer (ecuación 5.5) y de segundo orden (ecuación 5.6)⁷⁴.

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - K_1 \cdot t \quad (5.5)$$

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} \cdot t \quad (5.6)$$

dónde Q_e es la máxima capacidad de adsorción de las MNPs, Q_t es la cantidad de metales pesados adsorbida a un cierto tiempo t , y k_1 y k_2 son las constantes cinéticas de la velocidad o tasa de adsorción.

Así pues, si las medidas obedecen un modelo cinético de primer orden, la representación gráfica de los valores de $\ln(Q_e - Q_t)$ frente al tiempo debe ajustarse a una recta; en el caso de que los datos experimentales sigan un modelo cinético de segundo orden, será la gráfica de los valores de t/Q_t frente al tiempo la que se ajuste a una línea recta. Ambas representaciones, con los datos correspondientes tanto a los ensayos con arsénico como con mercurio, se muestran en la Figura 5.36.

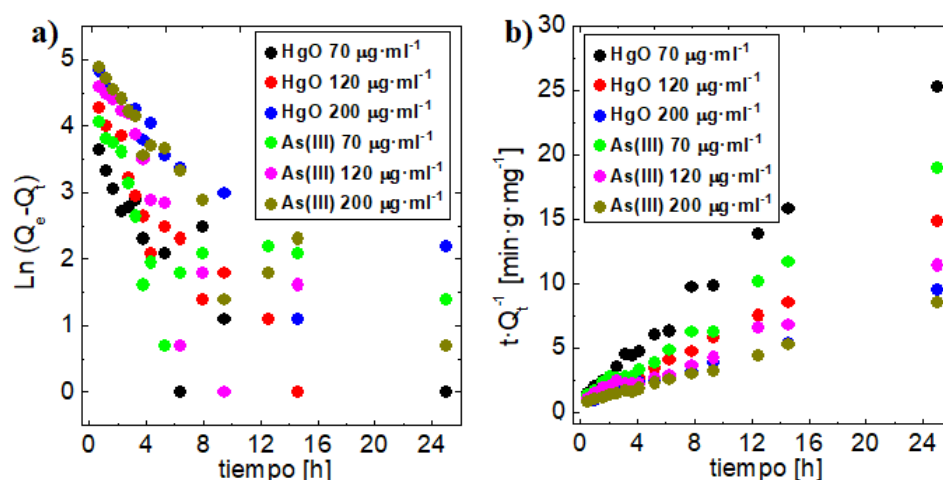


Figura 5.36: Representaciones gráficas de los datos de las cinéticas de adsorción en función de los modelos cinéticos de a) primer y b) segundo orden. Incertidumbre máxima inferior al $\pm 8\%$.

Como se puede observar claramente de esta Figura, los valores de t/Q_t frente al tiempo (Figura 5.36b) se ajustan a rectas mucho mejor que los de $\ln(Q_e - Q_t)$, lo que significa que los datos experimentales obtenidos obedecen un modelo cinético de segundo orden. Esto implica que el mecanismo por el que los contaminantes se adhieren a la superficie de las MNPs es una adsorción química o quimisorción⁷⁴. Los valores de los parámetros resultantes de estos ajustes lineales permiten la determinación del valor máximo de contaminantes adsorbidos por las MNPs bajo cada condición analizada (Q_e), así como de la constante/tasa de adsorción K_2 . Dichos valores, junto con los coeficientes de correlación de los ajustes efectuados, se muestran en la Tabla 5.13.

Tabla 5.13: Coeficientes de correlación y valores de los parámetros de ajuste al modelo cinético de segundo orden de los datos recogidos en la Figura 5.34.

	As(III)			HgO		
C [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	70	120	200	70	120	200
Q_e [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	79.4	138.9	183.2	58.2	103.3	169.8
K_2 [$\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	$2.5\cdot 10^{-4}$	$6.1\cdot 10^{-5}$	$4.9\cdot 10^{-5}$	$3.1\cdot 10^{-4}$	$1.5\cdot 10^{-4}$	$5.2\cdot 10^{-5}$
R	0.988	0.985	0.997	0.994	0.996	0.991

Los coeficientes de correlación de las rectas de ajuste, superiores o muy próximos en todos los casos a 0.99, confirman que en todos los ensayos los datos experimentales se ajustan de forma muy exacta al modelo cinético de segundo orden. Por su parte, los valores de las capacidades máximas de adsorción resultantes de los ajustes para cada uno de los dos contaminantes a las tres concentraciones ensayadas son coincidentes con las previamente determinadas tanto en los ensayos cinéticos como en las pruebas de depuración tras 24 h de incubación. Por último, los valores obtenidos para las constantes/tasa de adsorción K_2 sirven para ofrecernos una idea aproximada de la velocidad a la que los metales pesados son adsorbidos sobre la superficie de las MNPs de óxido de hierro a las diferentes concentraciones. Por lo general, como ya se podía deducir observando las curvas de las cinéticas de adsorción, estas son mayores cuanto mayor es la concentración de las disoluciones de metales pesados, ya que aunque en las disoluciones concentradas se tarda más tiempo en alcanzar el régimen de saturación también es mayor la cantidad de contaminantes que se retiene sobre las superficies de las MNPs. Nótese que las unidades de las constantes K_2 obtenidas son $\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, es decir, el inverso de la cantidad de metales pesados adsorbida a las superficies de las MNPs (en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) por unidad de tiempo, por lo que se puede entender como el inverso de la velocidad de adsorción. Por ello, en general, los sistemas de elevada concentración, dónde las MNPs adsorben los contaminantes a un ritmo alto, presentan un bajo valor de K_2 .

5.3. Bibliografía

1. Pérego, E. A. *et al.* Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Appl. Phys. Rev.* **2**, 041302 (2015).
2. Beik, J. *et al.* Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *J. Control. Release* **235**, 205–221 (2016).
3. Soliman, M. G., Pelaz, B., Parak, W. J. & Del Pino, P. Phase transfer and polymer coating methods toward improving the stability of metallic nanoparticles for biological applications. *Chem. Mater.* **27**, 990–997 (2015).
4. Hergt, R. & Dutz, S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a

- visionary tumour therapy. *J. Magn. Magn. Mater.* **311**, 187–192 (2007).
5. Deatsch, A. E. & Evans, B. A. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **354**, 163–172 (2014).
 6. Jin, R., Lin, B., Li, D. & Ai, H. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: Design considerations and clinical applications. *Curr. Opin. Pharmacol.* **18**, 18–27 (2014).
 7. Gas, P. & Miaskowski, A. Specifying the ferrofluid parameters important from the viewpoint of magnetic fluid hyperthermia. in *2015 Selected Problems of Electrical Engineering and Electronics, WZEE 2015* 1–6 (IEEE, 2016). doi:10.1109/WZEE.2015.7394040
 8. Kita, E. *et al.* Ferromagnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia and thermoablation therapy. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **43**, 474011 (2010).
 9. Lee, N. & Hyeon, T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2575–2589 (2012).
 10. Jun, Y. W. *et al.* Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5732–5733 (2005).
 11. Ahmad, T. *et al.* Particle size dependence of relaxivity for silica-coated iron oxide nanoparticles. *Curr. Appl. Phys.* **12**, 969–974 (2012).
 12. Shapiro, E. M. *et al.* MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 10901–10906 (2004).
 13. Wu, Z., Li, W., Webley, P. A. & Zhao, D. General and controllable synthesis of novel mesoporous magnetic iron oxide@carbon encapsulates for efficient arsenic removal. *Adv. Mater.* **24**, 485–491 (2012).
 14. Lee, J. H. *et al.* Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 418–422 (2011).
 15. Cabrera, D. *et al.* Dynamical Magnetic Response of Iron Oxide Nanoparticles

- Inside Live Cells. *ACS Nano* **12**, 2741–2752 (2018).
16. Sathya, A. *et al.* CoFe₃-xO₄ Nanocubes for Theranostic Applications: Effect of Cobalt Content and Particle Size. *Chem. Mater.* **28**, 1769–1780 (2016).
 17. Noh, S. H. *et al.* Nanoscale magnetism control via surface and exchange anisotropy for optimized ferrimagnetic hysteresis. *Nano Lett.* **12**, 3716–3721 (2012).
 18. Bell, G. *et al.* Enhancing the Magnetic Heating Capacity of Iron Oxide Nanoparticles through Their Postproduction Incorporation into Iron Oxide–Gold Nanocomposites. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2385 (2017).
 19. Guardia, P. *et al.* One pot synthesis of monodisperse water soluble iron oxide nanocrystals with high values of the specific absorption rate. *J. Mater. Chem. B* **2**, 4426–4434 (2014).
 20. Kötitz, R., Weitschies, W., Trahms, L. & Semmler, W. Investigation of Brownian and Néel relaxation in magnetic fluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **201**, 102–104 (1999).
 21. Motoyama, J. *et al.* Size dependent heat generation of magnetite nanoparticles under AC magnetic field for cancer therapy. *Biomagn. Res. Technol.* **6**, 4 (2008).
 22. Silva, A. C. *et al.* Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 591–603 (2011).
 23. Salazar-Alvarez, G. *et al.* Cubic versus spherical magnetic nanoparticles: The role of surface anisotropy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13234–13239 (2008).
 24. Leslie-Pelecky, D. L. & Rieke, R. D. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chem. Mater.* **8**, 1770–1783 (1996).
 25. Alborzi, Z., Hassanzadeh, A. & Golzan, M. M. Superparamagnetic Behavior of the Magnetic Hysteresis Loop. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol* **8**, 93–98 (2012).
 26. Meikle, S. T., Piñeiro, Y., Bañobre López, M., Rivas, J. & Santin, M. Surface functionalization superparamagnetic nanoparticles conjugated with

- thermoreponsive poly(epsilon-lysine) dendrons tethered with carboxybetaine for the mild hyperthermia-controlled delivery of VEGF. *Acta Biomater.* **40**, 235–242 (2016).
27. Karimzadeh, I. *et al.* A novel method for preparation of bare and poly(vinylpyrrolidone) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Mater. Lett.* **179**, 5–8 (2016).
28. Phong, P. T., Nguyen, L. H., Manh, D. H., Lee, I. J. & Phuc, N. X. Computer Simulations of Contributions of Néel and Brown Relaxation to Specific Loss Power of Magnetic Fluids in Hyperthermia. *J. Electron. Mater.* **46**, 2393–2405 (2017).
29. Vuong, Q. L., Gillis, P., Roch, A. & Gossuin, Y. Magnetic resonance relaxation induced by superparamagnetic particles used as contrast agents in magnetic resonance imaging: a theoretical review. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **9**, e1468 (2017).
30. Lee, N. *et al.* Magnetosome-like ferrimagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2662–2667 (2011).
31. Cheong, S. *et al.* Simple synthesis and functionalization of iron nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 4206–4209 (2011).
32. Huang, J. *et al.* Effects of nanoparticle size on cellular uptake and liver MRI with polyvinylpyrrolidone-coated iron oxide nanoparticles. *ACS Nano* **4**, 7151–7160 (2010).
33. Stephen, Z. R., Kievit, F. M. & Zhang, M. *Magnetite nanoparticles for medical MR imaging. Materials Today* **14**, (2011).
34. Guo, X. *et al.* Appropriate Size of Magnetic Nanoparticles for Various Bioapplications in Cancer Diagnostics and Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 3092–3106 (2016).
35. Ni, D., Bu, W., Ehlerding, E. B., Cai, W. & Shi, J. Engineering of inorganic nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem. Soc. Rev.*

- 46**, 7438–7468 (2017).
36. Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J. & Lauffer, R. B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **99**, 2293–2352 (1999).
 37. Wang, Y.-X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant Imaging Med Surg* **1**, 35–44 (2011).
 38. Ghosh Chaudhuri, R. & Paria, S. Core/shell nanoparticles: Classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chem. Rev.* **112**, 2373–2433 (2012).
 39. Zhang, Q. *et al.* Model Driven Optimization of Magnetic Anisotropy of Exchange-Coupled Core-Shell Ferrite Nanoparticles for Maximal Hysteretic Loss. *Chem. Mater.* **27**, 7380–7387 (2015).
 40. Marcus, M. *et al.* Iron oxide nanoparticles for neuronal cell applications: Uptake study and magnetic manipulations. *J. Nanobiotechnology* **14**, 37 (2016).
 41. Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K. & Abdollahi, M. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iran. Biomed. J.* **20**, 1–11 (2016).
 42. López-García, J., Lehocký, M., Humpolíček, P. & Sáha, P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *J. Funct. Biomater.* **5**, 43–57 (2014).
 43. Karovic, O. *et al.* Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1 α . *Biochem. Pharmacol.* **73**, 694–708 (2007).
 44. Kwon, Y. M. *et al.* Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages in vitro. *Biomed. Mater.* **4**, 025018 (2009).
 45. Pan, Y. *et al.* Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* **3**, 1941–1949 (2007).

46. Chen, L., Liu, L., Li, Y. & Gao, J. Melatonin increases human cervical cancer HeLa cells apoptosis induced by cisplatin via inhibition of JNK/Parkin/mitophagy axis. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **54**, 1–10 (2018).
47. Villanueva, A. *et al.* The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology* **20**, 115103 (2009).
48. Scheffel, D. L. S. *et al.* Transdental cytotoxicity of glutaraldehyde on odontoblast-like cells. *J. Dent.* **43**, 997–1006 (2015).
49. Esquinazi, P. *et al.* Ferromagnetism in oriented graphite samples. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **66**, 1–10 (2002).
50. Di Corato, R. *et al.* Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials* **35**, 6400–6411 (2014).
51. Caruntu, D., Caruntu, G. & O'Connor, C. J. Magnetic properties of variable-sized Fe₃O₄ nanoparticles synthesized from non-aqueous homogeneous solutions of polyols. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **40**, 5801–5809 (2007).
52. Cullity, B. D. & Graham, C. D. *Introduction to Magnetic Materials, Second Edition, Chapter 7 on Magnetic Anisotropy.* (2009).
53. Gajanan, K. & Tijare, S. N. Applications of nanomaterials. *Mater. Today Proc.* **5**, 1093–1096 (2018).
54. Deissler, R. J., Wu, Y. & Martens, M. A. Dependence of Brownian and Néel relaxation times on magnetic field strength. *Med. Phys.* **41**, 012301 (2014).
55. Muxworthy, A. R. & Williams, W. Critical superparamagnetic/single-domain grain sizes in interacting magnetite particles: Implications for magnetosome crystals. *J. R. Soc. Interface* **6**, 1207–1212 (2009).
56. Jacukowicz-Sobala, I., Ociński, D. & Kociolek-Balawejder, E. Synthesis and Evaluation of a Novel Hybrid Polymer Containing Manganese and Iron Oxides as a Sorbent for As(III) and As(V) Removal. *Ind. Eng. Chem. Res.* **52**, 6453–6461 (2013).

57. Qu, J. Research progress of novel adsorption processes in water purification: A review. *J. Environ. Sci.* **20**, 1–13 (2008).
58. Chalasani, R. & Vasudevan, S. Cyclodextrin functionalized magnetic iron oxide nanocrystals: a host-carrier for magnetic separation of non-polar molecules and arsenic from aqueous media. *J. Mater. Chem.* **22**, 14925 (2012).
59. Luo, X. *et al.* Adsorption of As (III) and As (V) from water using magnetite Fe₃O₄-reduced graphite oxide-MnO₂ nanocomposites. *Chem. Eng. J.* **187**, 45–52 (2012).
60. Jiang, J., Oberdörster, G. & Biswas, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanoparticle Res.* **11**, 77–89 (2009).
61. Cheng, W. *et al.* Dispersion-precipitation synthesis of nanosized magnetic iron oxide for efficient removal of arsenite in water. *J. Colloid Interface Sci.* **445**, 93–101 (2015).
62. Balcells, L. *et al.* One-Step Route to Iron Oxide Hollow Nanocuboids by Cluster Condensation: Implementation in Water Remediation Technology. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 28599–28606 (2016).
63. Yu, L. *et al.* Arsenite removal from aqueous solutions by γ -Fe₂O₃-TiO₂ magnetic nanoparticles through simultaneous photocatalytic oxidation and adsorption. *J. Hazard. Mater.* **246–247**, 10–17 (2013).
64. Chiarle, S., Ratto, M. & Rovatti, M. Mercury removal from water by ion exchange resins adsorption. *Water Res.* **34**, 2971–2978 (2000).
65. Fairhurst, D. An Overview of the Zeta Potential - Part 3: Uses and Applications. *American Pharmaceutical Review* 1–7 (2013). Available at: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/139288-An-Overview-of-the-Zeta-Potential-Part-3-Uses-and-Applications/>. (Accessed: 4th October 2018)
66. Parks, G. A. *The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides, and aqueous hydroxide complex systems.* *Chemical Reviews* **65**, (1965).

67. Atomic Radius of the elements. Atomic Radius for all the elements in the Periodic Table. *Atomic Radius of the elements* Available at: <http://periodictable.com/Properties/A/AtomicRadius.v.html>. (Accessed: 28th August 2018)
68. Butt, H.-J., Graf, K. & Kappl, M. *Physics and Chemistry of Interfaces*. (Wiley-VCH, 2003). doi:10.1002/3527602313
69. Frost, J. How to Interpret Regression Analysis Results. Available at: <http://statisticsbyjim.com/regression/interpret-r-squared-regression/>.
70. Guo, X. & Chen, F. Removal of arsenic by bead cellulose loaded with iron oxyhydroxide from groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 6808–6818 (2005).
71. Schneider, P. Adsorption isotherms of microporous-mesoporous solids revisited. *Appl. Catal. A, Gen.* **129**, 157–165 (1995).
72. Smith, A. H., Lingas, E. O. & Rahman, M. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: A public health emergency. *Bull. World Health Organ.* **78**, 1093–1103 (2000).
73. Berg, M. *et al.* Arsenic contamination of groundwater and drinking water in Vietnam: A human health threat. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2621–2626 (2001).
74. Wu, F. C., Tseng, R. L. & Juang, R. S. Enhanced abilities of highly swollen chitosan beads for color removal and tyrosinase immobilization. *J. Hazard. Mater.* **81**, 167–177 (2001).

6. Conclusiones/Conclusions

En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado diferentes sistemas magnéticos nanoestructurados con potenciales aplicaciones en diferentes áreas biomédicas y en la eliminación de metales pesados de efluentes acuosos mediante adsorción superficial. Los procesos sintéticos efectuados, la caracterización de los nanosistemas obtenidos y los estudios llevados a cabo acerca de su potencial implementación en las citadas aplicaciones dieron lugar a las siguientes Conclusiones, que se agrupan según los distintos Capítulos de los que consta esta Tesis Doctoral.

Capítulo 2

- Se han logrado establecer las condiciones sintéticas adecuadas para la obtención, mediante la técnica de descomposición térmica, de MNPs de morfología cúbica altamente monodispersas y estables coloidalmente. Así, se consiguieron sintetizar nanocubos con longitudes de arista en el rango de ca. 25 a 100 nm. De cara a la modificación del tamaño de las MNPs obtenidas, la variación de la concentración de los diferentes compuestos precursores se demostró como el factor clave que permite modificar esta parámetro en un rango más amplio, si bien cambios en otros factores como la velocidad de calentamiento, o el tiempo y la temperatura de reacción también dan lugar a NPs con distintas dimensiones. Además, mediante la modificación de la razón entre la cantidad de precursores magnéticos y la cantidad de agentes estabilizantes, y la modificación de la velocidad de calentamiento a 15 °C/min, también se consiguieron MNPs con otras morfologías, tales como octaedros y cubooctaedros. Los nanosistemas magnéticos obtenidos fueron caracterizados estructuralmente, determinando la fase cristalina magnetita (Fe_3O_4) como la predominante en los mismos. Asimismo, también se estudió el recubrimiento superficial de las MNPs obtenidas, comprobando la presencia de los compuestos estabilizantes empleados en las síntesis (ácido oleico).
- Mediante la sustitución parcial del precursor ferroso por los precursores de otros elementos metálicos como manganeso, cobalto o zinc se obtuvieron MNPs de

diferentes composiciones (dopajes). Se comprobó a través de su análisis composicional la incompleta incorporación de los compuestos dopantes en la estructura de las MNPs, siendo el cobalto el que lo hace en mayor grado, seguido de zinc y manganeso, respectivamente. Los diferentes porcentajes de incorporación se atribuyeron, por una parte, a las distintas zonas de disposición de los cationes metálicos en la estructura de espinela de la magnetita (debido a sus diferentes configuraciones electrónicas) y, por otra, a los distintos tamaños y pesos atómicos de los mismos. De este modo, la alta incorporación del cobalto se atribuyó a su disposición exclusiva en las posiciones octaédricas de la estructura, las cuales son mayoritarias, mientras que la baja incorporación de manganeso se achacó a su disposición parcial en las posiciones tetraédricas y a su muy elevado tamaño atómico. Por otra parte, se demostró que los grados de sustitución muy elevados del precursor ferroso por los demás precursores metálicos pueden dar lugar a pequeñas pérdidas de morfología en las MNPs cúbicas, pasando a presentar estas unas aristas ligeramente rugosas.

- Se consiguió la transferencia a medio acuoso de los nanosistemas magnéticos de simetría cúbica mediante diferentes procesos alternativos. Así, se ensayaron tanto un proceso de recubrimiento polimérico con el complejo PMA-dodecilamina como un proceso de intercambio de ligando utilizando la molécula DMSA. En ambos casos, se verificó la correcta unión de los agentes estabilizantes a la superficie de las MNPs demostrándose, sin embargo, que el recubrimiento con PMA-dodecilamina es más eficiente de cara a prevenir la interacción dipolar entre las partículas y su consiguiente agregación. Se estableció experimentalmente la cantidad de polímero que es necesaria utilizar en el proceso de funcionalización para que los nanocubos sean estables en medio acuoso. Finalmente, se demostró que los nanocubos con la cubierta polimérica son completamente estables en medios fisiológicos, y sólo tras 72 h de incubación en los de composición más compleja aparecen ligeros síntomas de agregación de NPs en la forma de clústers.
- Se caracterizaron magnéticamente los diferentes tipos de nanocubos obtenidos a través de la determinación de sus ciclos de histéresis en sus curvas de magnetización frente al campo magnético aplicado. Se comprobó, en primer

lugar, que todos los nanosistemas presentaban unos ciclos de histéresis de área no nula a temperatura ambiente, confirmándose su carácter ferrimagnético, consecuencia de sus dimensiones (superiores en todos los casos a ca. 30 nm). Se analizó la dependencia de los ciclos de histéresis con la temperatura, determinándose el aumento simultáneo de esta magnitud y de los campos coercitivos y magnetizaciones de saturación y remanente; así como su dependencia con el tamaño de las MNPs, dando lugar a unos ciclos de histéresis con un área más grande en las partículas de mayores dimensiones. Por último, se analizó la influencia de los diferentes dopajes sobre las propiedades magnéticas de las diferentes NPs dopadas, concluyendo que los dopajes con cobalto dan lugar a importantes incrementos en el campo coercitivo y a disminuciones en las magnetizaciones de saturación, si bien estas menos relevantes. Los dopajes con zinc, por su parte, generan importantes incrementos en las magnetizaciones de saturación, especialmente cuando la estequiometría de este elemento dopante es de ca. 0.30, siendo menor su influencia sobre los campos coercitivos. La reducida cantidad de sistemas dopados con manganeso que se obtuvieron, dada la dificultad para incorporar este sistema a la estructura de las MNPs, impidió llevar a cabo un análisis exhaustivo de la influencia de este elemento en las propiedades magnéticas de las NPs.

Capítulo 3

- Se han logrado establecer las condiciones sintéticas adecuadas para la obtención, mediante la técnica de descomposición térmica, de MNPs de morfología esférica monodispersas y coloidalmente estables. Así, se obtuvieron MNPs de óxido de hierro de forma esférica de diámetros comprendidos entre ca. 5 y 15 nm, demostrándose nuevamente que la concentración de los reactivos en la disolución precursora es el factor clave que influencia el tamaño de los nanosistemas sintetizados. Además, y usando estas nanoestructuras como semillas, se creció alrededor de estas una nueva capa de material magnético para obtener MNPs de forma esférica y con estructura núcleo-coraza, esta última con tamaños controlables en el rango de 1.5 a 6.5 nm. La modificación del espesor de las corazas se logró variando la razón entre la cantidad de núcleos añadida y la cantidad de compuestos precursores del recubrimiento magnético. El estudio

sintético de este tipo de NPs se centró, particularmente, en la obtención de partículas con núcleos de óxido de hierro dopados con cobalto y corazas de óxido de hierro dopadas con manganeso, si bien se demostró la posibilidad de incluir otros elementos dopantes en las dos partes constituyentes de este tipo de MNPs. La caracterización de los nanosistemas obtenidos demostró la fase cristalina Fe_3O_4 como la más abundante en los mismos.

- Tomando de partida MNPs de forma esférica con un diámetro aproximado de 8.50 nm, se realizó un completo estudio sobre la inclusión de los elementos dopantes manganeso, cobalto y zinc en la estructura de estas partículas, ensayando la sustitución parcial del precursor ferroso por los precursores de estos elementos en diferentes proporciones y combinaciones (dopajes simples, dobles o triples). Mediante análisis composicional, se comprobó que en ningún sistema se produjo la incorporación total de los elementos dopantes, observándose un comportamiento bastante similar que el caso de las MNPs cúbicas del Capítulo previo. Se comprobó, además, que los elementos ensayados se incorporaban de forma consistente, independientemente del tipo de dopaje y del grado de sustitución, no dando lugar en ningún caso a pérdidas de morfología o alteraciones en la monodispersidad de las MNPs. Los diferentes porcentajes de incorporación se atribuyeron, nuevamente, a las distintas zonas de disposición de los cationes metálicos en la estructura de espinela de la magnetita, debido a sus diferentes configuraciones electrónicas, y a los distintos tamaños y pesos atómicos de los mismos. Los grados de incorporación de los dopantes determinados mediante análisis composicional se establecieron como coherentes con una disposición preferente de los cationes de cobalto y zinc en las pociones octaédricas y tetraédricas, respectivamente, ocupando el manganeso los lugares libres en los dopajes múltiples.
- Se consiguió la transferencia a medio acuoso de los nanosistemas magnéticos sintetizados, en este caso únicamente ensayando la técnica de recubrimiento polimérico con el complejo PMA-dodecilamina. Experimentalmente se estableció la cantidad de polímero que es necesaria utilizar en el proceso de funcionalización para que los nanosistemas pasen a ser estables en medio acuoso, demostrándose nuevamente que esta debe ser mayor cuanto mayor sea el

tamaño de las MNPs. Se verificó la correcta unión del compuesto a la superficie de las MNPs y la ausencia de agregación de estas tras el proceso de funcionalización. La estabilidad de las MNPs recubiertas poliméricamente fue estudiada en distintos medios biológicos de interés, siendo esta completa tras las primeras 72 h de incubación, y únicamente estas MNPs tras 96 h en aquellos fluidos con composiciones más complejas.

- Todas las MNPs dopadas y aquellas con estructura núcleo-coraza fueron caracterizadas magnéticamente mediante la determinación de sus ciclos de histéresis en las curvas de magnetización frente a campo magnético aplicado, y de sus curvas FC y ZFC. En primer lugar, se observó que todos los nanosistemas presentaban unos ciclos de histéresis con un área prácticamente nula a temperatura ambiente demostrándose, de este modo, su carácter superparamagnético, consecuencia de sus reducidas dimensiones. Este comportamiento fue corroborado por las curvas FC y ZFC, cuya intersección tuvo lugar en todos los casos por debajo de la temperatura ambiente. Para las MNPs de estructura homogénea de ca. 8.50 nm de diámetro se analizó la variación de los ciclos de histéresis en función de sus diferentes dopajes, concluyendo nuevamente que las sustituciones con cobalto dan lugar a importantes incrementos en el campo coercitivo, mientras que los dopajes con zinc generan importantes incrementos en las magnetizaciones de saturación, especialmente cuando la estequiometría de este elemento dopante es ca. 0.30. La influencia del manganeso, por su parte, se determinó como menor, si bien su presencia en elevado porcentaje puede dar lugar a disminuciones en las dos magnitudes características de los ciclos de histéresis anteriormente mencionadas. En los nanosistemas con dopajes múltiples, como norma general, se comprobó que se mezclan los efectos de los distintos elementos en función del porcentaje en el que estos estén presentes en el seno de las MNPs. En las partículas con estructura núcleo-coraza se estableció que, como norma general, el crecimiento de corazas con espesores sucesivamente mayores da lugar a aumentos en las saturaciones y a disminuciones en los campos coercitivos. Estas variaciones se atribuyeron, en primera instancia y a la espera de un análisis exhaustivo del acoplamiento entre núcleos y corazas, a la mayor o menor influencia del

aumento de tamaño de las MNPs y de la presencia creciente del manganeso en lugar de cobalto al crecer las corazas.

Capítulo 4

- Se han logrado obtener MNPs de óxido de hierro en la forma de películas delgadas mediante la técnica de litografía de copolímeros de bloque, usando para tal fin un copolímero de bloque de la familia de los poliestireno-*block*-poli-4-vinilpiridina (PS-*b*-P4VP). Se llevó a cabo un estudio completo de la influencia de los diferentes parámetros del proceso de síntesis, estableciéndose el dioxano como el disolvente selectivo idóneo en el que preparar las disoluciones precursoras de copolímero y precursor magnético, así como una temperatura de mezcla y de reacción de las mismas de 80 °C.
- Se analizó la influencia de la razón molar entre copolímero y precursor magnético sobre la arquitectura final de las películas delgadas formadas, determinándose que una razón en el rango de 1.0:0.5 y 1.0:1.0, dependiendo del post-procesado de las muestras, es el valor umbral de cara a la obtención de sistemas nanoestructurados en los que las MNPs se dispongan de forma individual y cuasi-ordenada en películas delgada, con una densidad superficial lo suficientemente baja como para no formar agregados. A mayores cantidades relativas de precursor magnético las MNPs llegan a constituirse en una especie de microtamiz poroso que recubre la práctica totalidad de los sustratos.
- En lo referente al post-procesado de las películas delgadas, se estudiaron dos procedimientos alternativos de cara a acelerar la conformación final de estas tras su preparación mediante la técnica de espín-coating: un tratamiento en vacío primario y un tratamiento en atmósfera de dioxano. Se demostró que el segundo es más eficiente de cara a la formación de películas delgadas homogéneas en toda la superficie de los sustratos. Asimismo, se ensayaron dos protocolos alternativos de cara a la reducción del precursor magnético para la formación de las MNPs de óxido de hierro y la eliminación de la plantilla polimérica: un tratamiento en plasma de oxígeno y un tratamiento de calcinación a alta

temperatura. En este caso, las diferencias entre ambos tratamientos fueron más reducidas, aunque se estableció el plasma de oxígeno como el procedimiento óptimo de cara a la obtención de MNPs con el más bajo grado de agregación posible.

- Mediante técnicas de análisis composicional se confirmó la presencia de hierro y oxígeno en la superficie de las películas delgadas, elementos constitutivos de las MNPs de óxido de hierro. Asimismo, también se estableció la hematita como la fase cristalina predominante en las muestras. Se midieron los espesores de varias de las películas delgadas preparadas mediante espín-coating, deparando valores muy reducidos, de menos de 20 nm en todos los casos, los cuales explican la baja señal magnética detectada en las medidas de magnetometría.

Capítulo 5

- Se midieron los valores de SAR de varias MNPs de forma cúbica previamente sintetizadas, en particular aquellas con longitudes de arista de ca. 30 y 40 nm con diferentes grados de dopaje, llegándose a alcanzar valores superiores a 1600 $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$. Los valores de SAR obtenidos en los nanocubos de 40 nm fueron notablemente superiores a los de los de 30 nm de similares composiciones. Se constató que la presencia de ciertos dopajes consiguen incrementar de forma muy relevante la capacidad hipotérmica de las MNPs cúbicas de similares características en cuanto a tamaño y morfología. Las MNPs con altas saturaciones son las que muestran un valor de SAR más elevado, mientras que los campos coercitivos elevados parecen no favorecer una capacidad hipotérmica especialmente relevante. Así, las MNPs con estequiometrías de zinc en el entono de 0.30 y de cobalto inferiores a ca. 0.20 son las que dan lugar a MNPs con mayores SAR. Por su parte, también se midieron las capacidades hipotérmicas de las MNPs esféricas con un diámetro de ca. 8.50 nm alcanzándose, en estos casos, valores máximos próximos a 100 $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$. Nuevamente se constató la posibilidad de incrementar de forma notoria los SAR de las MNPs de óxido de hierro esféricas mediante la introducción de elementos dopantes. En este caso, se evidenció una relación de proporcionalidad entre el

área de los ciclos de histéresis y las capacidades hipotérmicas medidas, siendo estas máximas en las MNPs con altas saturaciones y coercitividades simultáneas, lo que se traduce en dopajes elevados con cobalto, dopajes con zinc próximos a ca. 0.30, y presencias reducidas de manganeso que no reduzcan el valor de las dos magnitudes anteriormente citadas. La comparación normalizada entre los valores de SAR de las MNPs de simetría esférica y cúbica, dada las diferentes condiciones del campo magnético alterno aplicadas en cada caso, mostró una capacidad hipotérmica notablemente superior en los nanocubos de de ca. 30-40 nm que en las nanoesferas de ca. 8.50 nm debido, principalmente, a su mayor tamaño y simetría uniaxial.

- Se midieron los coeficientes de relajación transversal (r_2) de las MNPs de forma esférica de ca. 8.50 nm dando lugar, en algunas tipologías, a valores superiores a $100 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Estos representan una franca mejoría con respecto a los agentes de contraste más tradicionales, basados en gadolinio, siendo también ligeramente superiores a los de algunos agentes de contraste comerciales basados en NPs de óxidos de hierros y a los de MNPs de similares tamaños previamente estudiadas. Se analizó la influencia del grado de dopaje con los tres elementos metálicos ensayados sobre los coeficientes de relajación de las MNPs, determinándose el porcentaje de cobalto como el factor más importante para la obtención de elevados valores de r_2 . Así, dopajes individuales con este elemento en estequiometrías inferiores a ca. 0.50 son los que dan lugar a MNPs con una mayor capacidad como agentes de contraste negativos. Estos grados de dopaje con cobalto pueden ser incrementados ligeramente si se combinan con bajas cantidades de manganeso y/o zinc. También se determinaron los coeficientes de relajación transversal de varias MNPs de forma cúbica de ca. 30 y 40 nm de longitud de arista, obteniéndose en algunos de los nanosistemas magnéticos valores cercanos a $400 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. En este caso, el reducido número de muestras estudiadas no permitió llevar a cabo un análisis exhaustivo de la influencia de los diferentes elementos dopantes ensayados y del tamaño de los nanocubos. El valor anormalmente reducido de los coeficientes r_2 de algunos de los sistemas de nanocubos de ca. 40 nm parecen ser indicativos de una tendencia a la formación de agregados y precipitación de los nanocubos al ser sometidos a los elevados campos magnéticos implementados en las medidas de relajación.

- Aquellas MNPs que mostraron un mayor potencial como agentes hipertérmicos y como agentes de contraste en MRI fueron seleccionadas para su análisis en modelos biológicos *in vitro*, esto es, en cultivos celulares. Así, se determinaron las concentraciones críticas de citotoxicidad de las MNPs cúbicas y esféricas recubiertas poliméricamente después de distintos tiempos de incubación en diversas líneas celulares (HeLa, RAW 264.7 y MDA-MB-31), obteniéndose valores críticos superiores a $1.0 \cdot 10^{11}$ MNPs·ml⁻¹ en todos los casos. A este respecto, solo las MNPs que poseen importantes cantidades de cobalto en su estructura se mostraron como tóxicas dentro del rango de concentraciones estudiado en el tiempo de exposición más largo, probablemente consecuencia de una pequeña liberación de este elemento dopante (tóxico) en el medio celular. También se estudió la citotoxicidad de las MNPs cúbicas funcionalizadas con DMSA, mostrando estas umbrales críticos de citotoxicidad inferiores debido a la formación de ciertos agregados en el medio celular, lo que corroboró adicionalmente la idoneidad del recubrimiento con el complejo PMA-dodecilamina para aplicaciones biológicas. Asimismo, se estudió la internalización de las MNPs en células HeLa, comprobándose que tras 6 h de incubación un elevado porcentaje de las partículas ya había penetrado en el interior de aquellas. Finalmente, se evaluó la conservación de las propiedades magnéticas de los nanocubos tras su internalización, observándose unas ligeras variaciones en sus ciclos de histéresis y una caída en los valores de SAR en el entorno del 50%, asociados ambos fenómenos a la mayor viscosidad de los fluidos intracelulares y a posibles pequeños fenómenos de agregación entre las MNPs en el interior celular.
- Se evaluó la potencial implementación de las ferritas de ca. 8.50 nm de diámetro como agentes de depuración de medios acuosos contaminados con metales pesados, tales como mercurio y/o arsénico. Así, se midieron tasas de eliminación de los agentes contaminantes basados en mercurio y arsénico superiores a 500 y 400 mg de contaminante por gramo de MNPs empleadas. Se comprobó que los distintos nanosistemas magnéticos ensayados muestran unas capacidades de eliminación de los compuestos basados en mercurio y arsénico máximas a pH 5.5 y 10, respectivamente, consecuencia de los diferentes signos de las cargas superficiales de las MNPs y de las moléculas contaminantes a los distintos pH.

Asimismo, también se comprobó que la composición de la parte inorgánica de las MNPs (tipo y grado de dopaje) no tiene una importante influencia sobre su capacidad de biorremediación. Se efectuó también un análisis cinético de los procesos de adsorción, comprobándose que en los medios acuosos con concentraciones de contaminantes más elevadas se tarda más tiempo en alcanzar la saturación de la superficie de las MNPs, no obstante siendo en todos los casos este tiempo inferior a las 24 h. Además, se comprobó que las evoluciones temporales de los procesos de adsorción (cinéticas) se ajustan a un modelo de segundo orden, indicativo de que los contaminantes se adhieren a la superficie de las MNPs mediante procesos de quimisorción. Finalmente, se llevó a cabo la modelización de las curvas experimentales de la cantidad de contaminantes adsorbidos por las MNPs frente a la concentración de las disoluciones acuosas tratadas, determinando que estas se ajustan de forma fiel a la ecuación de la isoterma de adsorción de Langmuir.



In the present work, different nanostructured magnetic nanosystems with potential applications such as in medical imaging, diagnosis and treatment, and in pollutant removal have been developed. The synthetic processes carried out, the characterization of the obtained nanosystems and the analysis about their potential use in the aforementioned application gave rise to the following conclusions, which are grouped following the different Chapters of this PhD Thesis.

Chapter 2

- The suitable synthetic conditions for the obtaining of highly monodisperse and colloidally stable cubic shape MNPs by the technique of thermal decomposition have been established. In this manner, cubic particles with edge sizes in the range of ca. 25 to 100 nm were obtained. To modify the MNPs size, the variation of the different precursor's concentrations was demonstrated to be the key factor. Changes in other synthetic parameters such as the heating rate or the reaction temperature and time also contribute to obtain NPs with different dimensions. In addition, either by modifying the magnetic precursor/stabilizing agent molar ratio or by increasing the heating rate at $15\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ MNPs with other different morphologies as octahedrons and cube-octahedrons were also obtained. The synthesized MNPs were structurally characterized, determining the crystalline magnetite phase (Fe_3O_4) as the predominant. The analysis of the surface coating surrounding the MNPs was also analyzed, verifying the binding of the stabilizers used during the synthetic process.
- By partially replacing the ferrous precursor by those of other metallic elements such as manganese, cobalt or zinc, MNPs of different compositions (doping) were obtained. The incomplete incorporation of the different doping elements to the MNPs crystal structure was determined through compositional analysis, from which cobalt was observed to show the largest extent of incorporation, followed by zinc and manganese. This behavior was attributed to the different locations of the metal cations in the spinel structure of magnetite (as a consequence of their different electronic configurations) and to the different sizes and atomic weights of the metallic elements. Thus, the high incorporation

of cobalt ions was attributed to their unique location in the octahedral sites of the spinel structure, while the low incorporation of manganese was attributed to its partial setting in tetrahedral positions and very high atomic size. On the other hand, it was demonstrated that a very large substitution degree of the ferrous precursor for the aforementioned metallic counterparts could give rise to small losses of the cubic morphology, displaying these MNPs slightly rough edges.

- The transfer of cubic MNPs to aqueous-based media was achieved by means of two different alternative processes: a polymer coating process with the PMA-dodecylamine complex and a ligand exchange one using DMSA were tested. In both cases, the correct binding of the stabilizing agents to the MNPs surfaces was checked. The particles surface coating with PMA-dodecylamine showed a higher efficiency in terms of preventing the existing dipolar interaction between cubic particles and their subsequent aggregation. The polymer concentration required for a successful MNPs functionalization process was experimentally established. Finally, nanocubes with the polymeric coating were observed to be completely stable in physiological-mimicking media, and only after 72 h of incubation very slight NP aggregation in the form of cluster was noted in the most complex aqueous-based medium.
- The different cubic MNPs were magnetically studied through the characterization of the behavior of the magnetization in the presence of varying applied magnetic field. It was found that all the cubic nanoparticles showed hysteresis loops with quantifiable area at room temperature, confirming their ferrimagnetic behavior. This was as expected as a consequence of the obtained particle dimensions, higher than ca. 30 nm in all cases. The dependence of the hysteresis loops with the temperature was analyzed, observing that this quantity simultaneously increase as the coercive fields and the saturation and remnant magnetizations did; in addition, its dependence with MNPs sizes was also established, giving rise to hysteresis loops with larger areas for the biggest particles. Finally, the influence of the different types of doping on the magnetic properties of the present MNPs was analyzed. It was observed that doping with cobalt originated important increases in the coercive fields and decreases in saturation magnetizations. The doping with zinc, on the other hand, gave rise to

significant increases in saturation magnetizations, especially when the stoichiometry was ca. 0.30, with a lower influence on coercive fields. The very few manganese-doped nanosystems obtained, as a result of the difficulty to incorporate this element into the cubic MNPs structure, did not allow carry out an exhaustive analysis of the influence of it in the magnetic properties of the present cubic MNPs.

Chapter 3

- It has been possible to establish the suitable synthetic conditions for the obtaining of spherical-shape monodisperse MNPs with high colloidal stability by means of a thermal decomposition synthesis technique. Thus, spherical iron oxide MNPs with diameters between ca. 5 and 15 nm were obtained. Again, the concentration of the different reagents in the precursor solution and their mutual molar ratios were the key factors to enable the change of the size of the synthesized spherical nanoparticles. Besides, and using the MNPs as seeds, spherical magnetic core-shell particles were obtained through the growth of a magnetic shells around the formers. The modification of the shell thickness was achieved by changing the ratio between the number of added cores and the amount of shell metallic precursor in the synthetic process, obtaining shells with different widths in the range of 1.5 to 6.5 nm; in particular, cobalt-doped iron oxide nuclei and manganese-doped iron oxide shells were developed. The possibility of including other doping elements in the constituent parts of this type of nanosystems was also demonstrated. The characterization of these MNPs showed the crystalline Fe_3O_4 phase as the most abundant.
- A complete study about the potential inclusion of the doping metallic elements manganese, cobalt and zinc in the crystalline structure of ca. 8.50 nm spherical MNPs was carried out by means of the partial substitution in different proportions and combinations (single, double and triple doping) of the ferrous precursor by their metallic counterparts. Through compositional analysis, the incorporation of the different doping elements into the MNPs structure was noted to be incomplete, as in the case of cubic MNPs. It was also found that the analyzed doping metallic elements incorporated consistently regardless of the

type of doping and the substitution degree, not resulting in losses or alterations in the morphology and/or monodispersity of the spherical MNPs in any case. The different percentages of incorporation were attributed again to the different locations of the metal cations in the spinel structure of magnetite as a consequence of their different electronic configurations and atomic sizes and weights. The incorporation extents were established, being consistent with a preferred situation of cobalt and zinc cations in the octahedral and tetrahedral sites, respectively, occupying manganese ions the free ones under multiple doping conditions.

- The transfer to aqueous media of the synthesized spherical MNPs was made. In this case, only by the polymer coating technique using the PMA-dodecylamine complex. The polymer concentration required for a successful MNPs functionalization process was experimentally established. The correct binding of the polymer complex to the MNPs surface and the absence of aggregation after the coating process were verified. Finally, the stability of the polymer-coated spherical MNPs was analyzed in various biologically-relevant aqueous media, observing the complete stability of the particles within 72 h of incubation.
- The obtained iron oxide spherical MNPs with a diameter of ca. 8.50 nm and those with core-shell structure were magnetically characterized by means of the determinations of the hysteresis loops derives from the magnetization *vs.* applied magnetic field plots, and their ZFC and FC curves. Firstly, all spherical iron oxide nanoparticles showed hysteresis loops with negligible area at room temperature, demonstrating their superparamagnetic behavior, additionally corroborated by means of FC and ZFC plots, whose interaction took place below room temperature in all cases. In addition, for pure iron oxide MNPs of ca. 8.50 nm in diameter the variation of the hysteresis loops as a function of the doping type and extent was analyzed. As occurred for nanocubes, cobalt substitutions gave rise to important increases in the coercive fields, while doping with zinc generated important increases in saturation magnetizations, especially when the stoichiometry of this element was ca. 0.30. The influence of manganese was determined as smaller, but its presence in high proportions can lead to decreases in the two aforementioned characteristics magnitudes of the hysteresis loops. In

the spherical MNPs with multiple doping, as a general rule, a mix of magnetic effects proportional to the percentage of the doping element present in the particles composition was observed. On the other hand, for MNPs with core-shell structure, progressive thicker shells gave rise to increases in magnetic saturations and decreases in the coercive fields. These changes were attributed, at a first glance and requiring a more exhaustive analysis of the nuclei-shell couplings, to the influence of the increasing MNPs size and to the presence of manganese instead of cobalt upon shells growth.

Chapter 4

- Iron oxide MNPs in the form of hybrid thin films obtained by means of the block copolymer lithography technique were obtained. To do that, a polystyrene-*block*-poly-4-vinylpyridine (PS-*b*-P4VP) block copolymer was used as the template. A complete study about the influence of different parameters on the synthetic processes was carried out, determining dioxane as the selective solvent suitable to prepare the copolymer and the magnetic precursor solutions, as well as a mixing and reaction temperatures of ca. 80 °C.
- The influence of the copolymer to magnetic precursor molar ratio on the morphology of the derived thin films was analyzed. It was observed that a ratio between 1.0:0.5 and 1.0:1.0, depending on the post-processing conditions, was the threshold to obtain nanostructured films in which the MNPs are individually arranged with quasi-hexagonally order in the hybrid thin films, with a surface density low enough to avoid the formation or particle aggregates. Upon relative increases of the magnetic precursor concentration, the MNPs were able to form a kind of porous micro-layer which covered almost the whole substrates.
- Regarding the post processing procedure of hybrid thin films, two alternative procedures to accelerate the formation of the polymeric microdomains and improve their monodispersity were analyzed: vacuum and dioxane atmospheres. It was shown that the latter was the more efficient in order to get homogeneous hybrid thin films over the whole surface of the silicon wafers. Moreover, two

alternative protocols for the simultaneous reduction of the magnetic precursor for the formation of iron oxide MNPs and the removal of the polymeric template were assayed: oxygen plasma treatment and calcination at high temperatures. In this case, the differences between both processes were small, but oxygen plasma was established as the optimal to obtain MNPs with the lowest aggregation.

- Compositional analysis confirmed the presence of iron and oxygen on the surface of the hybrid thin films, which are the constitutive elements of iron oxide MNPs. Hematite was also established as the predominant crystalline phase in the film samples. The thicknesses of the thin films prepared by the spin-coating technique were measured, with values of less than 20 nm in all cases, which explained the low signal detected in the magnetometry measurements.

Chapter 5

- SAR values of the cubic MNPs were measured, particularly those with edge lengths of ca. 30 and 40 nm and different doping degrees. A maximum value of $1600 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ was reached. SAR values for 40 nm nanocubes were higher than those obtained for those of ca. 30 nm with similar compositions. Besides, the presence of certain doping elements in the cubic nanoparticles increased their hyperthermic capacity compared to bare iron oxide ones with similar characteristics in terms of size and morphology. Cubic MNPs with high saturations were those displayed very high SAR values, while high coercive fields did not favor the appearance of a particularly relevant magnetothermal effect. Thus, MNPs with zinc stoichiometries around ca. 0.30 and cobalt stoichiometries lower than 0.20 displayed the highest SAR. On the other hand, the magnetothermal capacities of spherical iron oxide MNPs of ca. 8.50 nm in size were also measured, with maximum SAR values close to $100 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$. Once again, the possibility of notoriously increasing their SAR through the incorporation of doping metallic elements was confirmed. In this case, a proportionally relationship between the hysteresis loops areas and the measured hyperthermic capacities was evidenced: maximum SAR values were registered for MNPs simultaneously having high saturations and coercive fields, that is, particles highly doped with cobalt, with

zinc to ca. 0.30 and with a reduced presence of manganese. The normalized comparison between SAR values of spherical and cubic MNPs (given the different conditions of the alternating magnetic fields applied in each case) highlighted a significantly higher magnetothermal capacity for the latter thanks to their larger size and higher symmetry.

- The transverse relaxation coefficients (r_2) of spherical iron oxide-based MNPs of ca. 8.50 nm measured were above $100 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, representing a clear improvement over the more traditional contrast agents such as those based on gadolinium, or other commercially available based on iron oxide NPs. The influence of the type and extent of doping of the present MNPs on the relaxation coefficients was also analyzed, showing the percentage of cobalt as key factor to obtain high values of r_2 : the individual doping with this element in stoichiometries less than 0.50 gave rise to MNPs with greater capacity as negative magnetic imaging contrast agents. The degree of doping can be increased slightly if cobalt is combined with low amounts of manganese and/or zinc. Transverse relaxation coefficients of several cubic MNPs with an edge length of ca. 30 and 40 nm were also determined, with values in some cases near ca. $400 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. For cubic MNPs, the reduced number of samples studied did not allow an exhaustive analysis of the influence of their different doping elements and the particles sizes on the contrast efficiency. The reduced value of the r_2 coefficients of some of the tested 40 nm-nanocubes might be indicative of certain tendency to aggregation formation and subsequent precipitation, especially when subject to high magnetic fields as those used in the magnetic relaxation measurements.
- Those MNPs showing the greatest potential as hyperthermic agents and as imaging contrast agents for MRI were selected for their analysis in *in vitro* biological models, that is, in cell cultures. Thus, the critical cytotoxic concentrations of cubic and spherical MNPs after different incubation times in different cell lines (HeLa, RAW 264.7 and MDA-MB-231) were determined, being above $1.0 \cdot 10^{11} \text{ MNPs} \cdot \text{mL}^{-1}$ in all cases. MNPs bearing significant amounts of cobalt in their crystal structure were the only ones which showed a toxic effect within the range of concentrations studied at the longest incubation times,

probably as a consequence of a small release of this doping element (toxic) in the medium. The cytotoxicity of cubic MNPs functionalized with DMSA was also analyzed, which displayed much lower critical cytotoxicities as a consequence of the formation of certain particle aggregates in the cell culture medium. This fact additionally corroborated the suitability of the PMA-dodecylamine coating for intended biological applications. Besides, the internalization of MNPs in HeLa cells was studied. It was noted that an incubation period of 6 h is enough to reach high particle internalization levels inside cells. Finally, an analysis of the magnetic properties of the nanocubes after their internalization into cells was also done, for which slight variations in their hysteresis loops and a ca. 50% decrease in their SAR values were noted, probably as a consequence of the higher viscosity of the cellular environment and a possible small aggregation of the MNPs.

- The potential use of the synthesized spherical nanoferrites with a diameter of ca. 8.50 nm as pollutant removal agents in heavy-metal contaminated aqueous environments was analyzed. Mercury and arsenic salt precursors were used as the toxic species. Cleaning extents of mercury and arsenic-based pollutants larger than 500 and 400 mg of pollutant per gram of MNPs were obtained. It was also found that MNPs showed a maximum removal capacity of mercury and arsenic at pH 5.5 and 10.0, respectively, this being a consequence of the different surface charges of MNPs and pollutant molecules at the different pH. Likewise, the composition of the inorganic part of the MNPs (type and extent of doping) did not have an important influence on their bioremediation capacity. A kinetic analysis of the heavy metal pollutants adsorption onto the particles surface was also performed, observing that in aqueous media with higher pollutant concentrations longer times were required to achieve the saturation of the magnetic adsorbents, but always below 24 h. In addition, the temporal evolution of the adsorption processes followed a second order model, indicating that heavy metal ions were adsorbed onto the MNPs surfaces by chemisorption. Finally, a modeling of the pollutant concentration adsorbed onto the MNPs vs. arsenic or mercury concentration plots was also performed, showing that adsorption process followed a Langmuir-type behavior.



